



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105229154 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 06

(21) 申请号 201380076047. X

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205

(22) 申请日 2013. 12. 18

代理人 冯剑明

(30) 优先权数据

13159527. 4 2013. 03. 15 EP

13/835, 589 2013. 03. 15 US

(51) Int. Cl.

C12N 15/81(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/077144 2013. 12. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/139608 EN 2014. 09. 18

(71) 申请人 龙沙有限公司

地址 瑞士菲斯普

(72) 发明人 D · 马塔诺维赫 B · 加塞尔

R · 普里尔霍弗

权利要求书3页 说明书38页

序列表7页 附图3页

按照条约第19条修改的权利要求书2页

按照条约第19条修改的声明或说明1页

(54) 发明名称

组成型启动子

(57) 摘要

本发明涉及一种包含启动子的分离的核酸序列,其是一种包含 SEQ ID 1 所示的 pCS1 的核酸序列或其有功能活性的变种的天然毕赤酵母序列,该变种是一种长度变种,一种突变体或 SEQ ID 1 的杂合序列,或其结合,涉及包含所述启动子的表达构建物和重组细胞,还涉及在所述启动子的控制下产生感兴趣的蛋白质的方法。本发明进一步涉及一种从真核细胞中识别组成型启动子的方法,和一种包含启动子的分离的核酸序列,该启动子在与编码 POI 的核苷酸序列可操作的连接时,指导其在宿主细胞中的表达水平高于在高和低生长速率的天然 pGAP 启动子控制下的表达水平。

1. 一种分离的核酸序列, 包含启动子, 所述启动子是包含 SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列的毕赤酵母的天然序列, 或者是具有其功能活性的变种, 所述变种是长度变种, 突变体或 SEQ ID 1 的杂交产物, 或其组合。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸序列, 其中所述启动子由所述 SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列或具有其功能活性的变种组成, 所述变种是长度变种, 突变体或 SEQ ID 1 的杂合序列, 或其组合。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的核酸序列, 其中, 所述具有功能活性的变种表现与所述 SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列实质相同的活性。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的核酸, 其中, 所述有功能活性的变种是:

a) 一种 SEQ ID 1 所示的长度变种, 优选包含选自由 SEQ ID 2、3、4、5、6、7 和 8 组成的组的核酸序列或由所述核酸序列组成, 最优选自由 SEQ ID 2、3、4、5 或 6 组成的组的核酸序列;

b) 一种 SEQ ID 1 所示的 pCS1 突变体, 或一种 a) 的长度变种的突变体, 该突变体与序列 SEQ ID 1 或与大小变体具有 60% 的同源性;

c) 一种杂合序列, 包含:

——一种选自由 SEQ ID 1 所示的 pCS1、一种 a) 的长度变种和一种 b) 的突变体组成的组的序列; 和

——至少一种进一步的序列, 选自由 SEQ ID 1 所示的 pCS1, 一种 a) 的长度变种, 一种 b) 的突变体和一种异源序列组成的组; 或

d) 一种序列, 其在严谨条件下与任何长度变种杂交, 或与 a) 或 b) 的突变体核酸序列杂交。

5. 根据权利要求 1 到 4 中的任一项所述的核酸序列, 其中, 所述有功能活性的变体选自由具有以下特征的同源序列组成的组:

i) 至少约 60% 的核苷酸序列一致性;

ii) 通过修饰所述 SEQ ID 1 所示的 pCS1 的核苷酸序列或其长度变种获得的同源序列, 或者通过插入、删除或替换所述序列内的或者序列的一个或两个末端的一个或多个核苷酸获得的同源序列, 优选地具有 80bp ~ 1500bp 的核苷酸序列, 更优选地, 具有至少 200bp 的核苷酸序列; 和

iii) 源自毕赤酵母以外的种的类似物。

6. 权利要求 1 到 5 中的任一项所述的核酸序列, 可操作地与一种编码感兴趣的蛋白 (POI) 的核苷酸序列连接, 该序列的核酸和所述编码 POI 的核苷酸序列并非天然关联的。

7. 根据权利要求 6 所述的核酸序列, 其进一步包含编码一信号肽的核酸序列, 所述信号肽能够实现 POI 的分泌, 优选地, 其中编码信号肽的核酸序列定位于与编码所述 POI 的核苷酸序列的 5' 端相邻。

8. 一种包含根据权利要求 1 至 7 的任一项所述核酸序列的表达构建物, 优选一种自主复制的载体或质粒, 或一种整合到宿主细胞的染色体 DNA 的表达构建物。

9. 一种重组宿主细胞, 其包含根据权利要求 1 至 7 的任一项所述核酸序列或根据权利要求 8 所述的一种表达构建物, 优选一种真核细胞, 更优选一种酵母或丝状真菌细胞, 更优选酵母属或毕赤酵母属的一种酵母细胞。

10. 权利要求 9 的所述的重组宿主细胞, 包含所述核酸序列的多拷贝, 和 / 或所述表达构建物的多拷贝。

11. 权利要求 9 或 10 的所述的重组宿主细胞, 其选自哺乳动物、昆虫、酵母、丝状真菌和植物细胞组成的组, 优选一种酵母, 优选毕赤酵母株 CBS 704、CBS 2612、CBS 7435、CBS 9173-9189、DSMZ 70877、X-33、GS115、KM71 和 SMD1168 中的任一种。

12. 根据权利要求 9、10 或 11 中的任一项所述的重组宿主细胞的多细胞稳定培养物。

13. 一种通过培养包含权利要求 1 至 7 的任一项所述启动子或权利要求 8 所述表达构建物并包含在启动子的转录控制下编码 POI 的核酸的重组宿主细胞系或权利要求 9 至 11 的任一项所述的重组宿主细胞生产 POI 的方法, 包含步骤:

- a) 在表达所述 POI 的条件下培养所述细胞系, 和
- b) 回收所述 POI。

14. 权利要求 13 所述的方法, 其中, 所述 POI 是在生长限制条件下表达。

15. 权利要求 13 或 14 所述的方法, 其中, 所述细胞系是在分批培养, 分批补料培养或连续培养下条件, 和 / 或在含限制性碳源的培养基中培养。

16. 权利要求 15 所述的方法, 其中, 所述培养是在生物反应器中进行, 从分批培养期开始, 随后是分批补料培养期或连续培养期。

17. 权利要求 13 至 16 中的任一项所述的方法, 其中, 所述 POI 是一种异源蛋白, 优选自治疗性蛋白质, 包括抗体或其片段、酶和多肽、蛋白质抗生素、毒素融合蛋白、碳水化合物-蛋白质结合物、结构蛋白、调节蛋白、疫苗和疫苗类蛋白质或微粒、加工酶、生长因子、激素和细胞因子, 或一种 POI 的代谢物。

18. 一种鉴定来自真核细胞的组成型启动子的方法, 包括步骤:

- a) 以高生长速率培养真核细胞;
- b) 进一步以低生长速率培养所述真核细胞;
- c) 提供步骤 a) 和 b) 的所述细胞培养物的样品,

d) 在所述样品实施转录分析, 将转录水平与所述细胞的所述天然 pGAP 启动子的转录水平比较; 和

f) 选择与所述高速率和低速率生长的天然 pGAP 启动子比较具有更高的转录强度的所述组成型启动子, 优选的, 通过确定所述经识别的组成型启动子的转录水平, 其至少是所述天然 pGAP 启动子的 1.1 倍。

19. 一种分离的包含一种启动子的核酸序列的用途, 当与编码感兴趣的蛋白 (POI) 的核苷酸序列可操作的连接时, 该启动子指导其在宿主细胞中的表达, 且表达水平高于高生长速率和低生长速率时的天然 pGAP 启动子控制下的表达水平, 优选在一种通过培养采用所述核酸序列转化的宿主细胞产生所述 POI 的方法中的用途, 其中所述培养是在生物反应器中实施, 以分批培养期开始, 随后为分批补料期或连续培养期。

20. 权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述表达水平在 0.015-0.15/h 范围内的高生长速率和低生长速率时确定。

21. 权利要求 19 或 20 所述的用途, 其中, 所述表达水平至少为 pGAP 启动子的 1.1 倍。

22. 权利要求 1 ~ 7 中任一项所述的分离的核酸序列或权利要求 8 所述的表达构建物在通过培养采用所述核酸序列和 / 或所述表达构建物转化的宿主细胞生产 POI 的方法中的

用途,优选地,其中所述培养是在生物反应器中实施,从分批培养期开始,随后是分批补料期或连续培养期。

组成型启动子

技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含强组成型启动子的分离的核酸序列和一种在该启动子控制下的在真核细胞培养基中生产感兴趣的蛋白的方法。

背景技术

[0002] 已采用真核宿主成功生产了重组蛋白。最著名的例子是酵母,如啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 或多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*),丝状真菌 (*filamentous fungi*),如泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) 或里氏木霉 (*Trichoderma reesei*),或哺乳动物细胞,例如中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 细胞。尽管某些蛋白已经实现高速率生产,许多其他蛋白质只能以比较低的产量获得。

[0003] 基因在宿主生物中的异源表达需要一种可实现宿主细胞的稳定转化的载体。该载体将提供具有紧邻编码序列 5' 端的功能启动子的基因。从而该启动子序列调节和启动转录。目前所用的大多数启动子来源于编码通常在细胞中以高浓度存在的蛋白的基因。

[0004] EP0103409A2 公开了和糖酵解途径中的特定酶的表达相关的酵母启动子的使用,例如涉及丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶、磷酸甘油酸变位酶、己糖激酶 1 和 2、葡糖激酶、磷酸果糖激酶、醛缩酶和糖酵解调节基因的启动子。

[0005] WO 97/44470 描述了源自解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 的转录延伸因子 1 (TEF1) 蛋白和适合在酵母中表达异源蛋白的核糖体蛋白 S7 的酵母启动子,并且 EP1951877A1 描述了生产异源蛋白的毕赤酵母 (*P. pastoris*) TEF1 启动子的使用。

[0006] WO2005003310 提供了在使用从产油酵母 (*oleaginous yeast*) 解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 的甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶或磷酸甘油变位酶启动子在酵母中表达感兴趣的编码序列的方法。

[0007] 源自涉及毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 甲醇代谢途径基因的启动子序列已经公开于 US4808537 和 US4855231 (醇氧化酶 AOX1、AOX2) 和 US6730499B1 (甲醛脱氢酶 FLD1) 中。US20080153126A1 包括基于 AOX1 启动子的突变体启动子序列。

[0008] AOX1 启动子仅受甲醇诱导,并受到其他碳源例如葡萄糖或乙醇的阻遏。甲醇的弊端是因为可能具有毒性和易燃性,不适合用于生产某些产品。因此,我们试图寻找 AOX1 启动子的替代物。

[0009] Vassileva 等人 (*J. Biotechnol.* (2001)88:21-35) 描述了使用多拷贝表达盒作为 AOX1 启动子的替代物,在毕赤酵母中使用 GAP 启动子表达乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)。提出了维持细胞在对数中期的连续培养的构成体系。

[0010] 毕赤酵母中使用的启动子或者受到严格调控 (像 pAOX 或 pFLD),对特定底物例如甲醇有活性,或者在许多不同的条件,培养基和底物中具有组成型活性。已经报道,在这些组成型启动子中,特别是 GAP 和 TEF 启动子对于重组蛋白的产生具有强的和有用的启动作用。

[0011] 但是,结果表明两种组成型启动子在分批补料生产过程中不是一直强启动的。特

别是在在该过程的后期,当细胞生长率低时,该启动子活性也降低,因此限制了感兴趣的基因(GOI)的表达和生产量(Stadlmayr 等人,2010. J Biotechnol. 150:519-529)。

[0012] 因为即使是高丰度的糖酵解酶例如烯醇酶(ENO),磷酸丙糖异构酶(TPI)或葡萄糖 6-磷酸异构酶(PGI)都没有如 pGAP 和 pTEF 一样强的启动子,因此选择合适的启动子不是凭直觉而是理性的。(Stadlmayr 等人 2010. J Biotechnol. 150:519-529 ;Gasser 等人. 2010. Metabolic Engineering 12:573-580)。

[0013] Qin 等人 (Applied and Environmental Microbiology (2011) 3600-3608) 报道了 GAP 启动子库和各种具有不同活性的启动子。

[0014] WO2007/015178A2 报道了能够诱导重组蛋白分泌生产的转录融合伴侣和毕赤酵母 cDNA 库。

[0015] CN102180954A 报道了采用毕赤酵母细胞壁蛋白 GCW14 作为锚定蛋白的细胞表面显示系统。

[0016] 需要的是提供改善的重组真核细胞系来生产可高产量分离的发酵产品。因此,本发明的目的是提供适合重组生产方法的可选择的调节元件,该调节元件是简单和高效的。

发明内容

[0017] 通过权利要求的主题解决了本发明的目标。

[0018] 本发明提供了一种包含启动子的分离核酸序列,该启动子是一种天然的毕赤酵母序列,包含 SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列或由该序列组成,或者其有功能活性的变种,它是一种长度变种,一种突变体或与其结合。

[0019] 根据一个特定方面,本发明提供了一种包含一种启动子的分离核酸序列,该启动子是一种天然的毕赤酵母序列,包含 SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列或由该序列组成,或是一种其有功能活性的变种,该有功能活性的变种是一种长度变种,一种 SEQ ID 1 的突变体或杂合序列,或其结合,其中,所述有功能活性的变种表现与 pCS1,特别是 SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列实质相同的活性。

[0020] 特别地,所述 pCS1 核酸序列与所述 SEQ ID 1 的序列相同。

[0021] 优选地,所述本发明的核酸序列与 WO2007/015178A2 的列表中的 SEQ ID 87 (即,本申请的 SEQ ID 24) 的核酸序列不相同。

[0022] 特别地,所述有功能活性的变种是

[0023] a) 一种 SEQ ID 1 所示的 pCS1 的长度变种,优选包含选自由 SEQ ID 2、3、4、5、6、7 和 8 组成的组的核酸序列或由该核酸序列组成;

[0024] b) 一种 SEQ ID 1 所示的 pCS1 的突变体,或一种 a) 的长度变种的突变体,其突变体具有与所述序列 SEQ ID 1 或所述长度变种至少 60% 的同源性;

[0025] c) 一种杂合序列,包含

[0026] ——一种选自由序列为 SEQ ID 1 所示的 pCS1、一种 a) 的长度变种和一种 b) 的突变体组成的组的序列;和

[0027] ——至少一种选自由 SEQ ID 1 所示的 pCS1、一种 a) 的长度变种、一种 b) 的突变体和一种异源序列组成的组的进一步的序列;或

[0028] d) 一种序列,所述序列在严谨条件下与任何长度变种杂交,或者与 a) 或 b) 的突变

体核酸序列杂交。

[0029] 优选地,所述 SEQ ID 1 所示的 pCS1 的长度变种由 SEQ ID 2、SEQ ID 3、SEQ ID 4、SEQ ID 5 或 SEQ ID 6 中任一项组成。

[0030] 根据一特别实施方式,所述有功能活性的变种选自由和下列序列同源的序列组成的组:

[0031] i) 至少约 60% 的核苷酸序列一致性;

[0032] ii) 通过修饰所述 SEQ ID 1 所示的 pCS1 的核苷酸序列或其长度变种获得的同源序列,或者通过插入、删除或替换所述序列内的或者一个或两个末端的一个或多个核苷酸获得的同源序列,优选地,具有 80bp ~ 1500bp,或 200bp ~ 1500bp 的核苷酸序列,更优选地,具有至少 200bp 的核苷酸序列;和

[0033] iii) 源自毕赤酵母以外的种的类似物。

[0034] 特别地,本发明的有功能活性的变种具有与 pCS1 实质相同的启动子活性。

[0035] 根据一特别实施方式,所述核酸序列与编码 POI 的核苷酸序列操作性连接,该核酸与编码 POI 的核苷酸序列并非天然相关的。

[0036] 根据一特别方面,所述核酸序列进一步包含实现 POI 分泌的信号肽基因,优选地,其中,所述信号肽基因定位于临近所述编码所述 POI 的核苷酸序列的 5' 端。

[0037] 相应地,本发明特别涉及一核酸序列,其进一步包含编码实现 POI 分泌的信号肽的核酸序列,优选地,其中,编码所述信号肽的核酸序列定位于临近所述编码 POI 的核苷酸序列的 5' 端处。

[0038] 本发明进一步提供了一种包含本发明所述核酸序列的表达构建物,优选地,提供一种自主复制载体或质粒,或一种整合到宿主细胞的染色体 DNA 的构建物。

[0039] 本发明进一步提供了一种包含本发明所述核酸序列或本发明的表达构建物的重组宿主细胞,优选地,提供一种真核细胞,更优选地,提供一种酵母或丝状真菌细胞,更优选地,提供一种酿酒酵母属或毕赤酵母细胞属的酵母细胞。

[0040] 根据一特别方面,所述重组宿主细胞包含多拷贝的所述核酸序列,和 / 或多拷贝的所述表达构建物。例如,所述包含 2, 3, 4, 或 5 个拷贝 (基因拷贝数 GCN) 的重组细胞。

[0041] 特别地,所述重组宿主细胞选自由哺乳动物、昆虫、酵母、丝状真菌和植物细胞组成的组,优选酵母,优选毕赤酵母株 CBS 704、CBS 2612、CBS 7435、CBS 9173-9189、DSMZ 70877、X-33、GS115、KM71 和 SMD1168 中的任一种。在某些实施方式中,所述重组宿主细胞是 X-33 以外的毕赤酵母菌株。

[0042] 本发明进一步提供本发明的细胞的稳定培养物。

[0043] 本发明进一步提供通过培养重组宿主细胞生产 POI 的方法,该重组宿主细胞包含本发明的核酸序列或启动子或本发明的表达构建物,和在所述启动子的转录控制下的编码 POI 的核酸,包含步骤:

[0044] a) 在表达所述 POI 的条件下培养所述细胞系,和

[0045] b) 回收所述 POI。

[0046] 特别地,所述 POI 是在生长限制条件下表达的,例如在低于最大生长速率的条件下培养细胞系,典型地,低于细胞最大生长速率的 90%,优选地,低于最大生长速率的 80%,低于最大生长速率 70%,低于最大生长速率 60%,低于最大生长速率 50%,低于最大

生长速率 40%，低于最大生长速率 30%，低于最大生长速率 20%，低于最大生长速率 10%，低于最大生长速率 5%，低于最大生长速率 3%，低于最大生长速率 2%，低于最大生长速率 1%，低于最大生长速率 0.5%，低于最大生长速率 0.4%，低于最大生长速率 0.3，或低于最大生长速率 0.2%。典型地，所述最大生长速率是针对特定宿主细胞单独确定的。

[0047] 根据一特别实施方式，所述细胞系是在分批培养、分批补料培养或连续培养条件下，和 / 或在包含限制性碳源的培养基中培养。

[0048] 特别地，所述培养是在生物反应器中实施，从分批培养期开始，随后是分批补料培养期或连续培养期。

[0049] 特别地，所述宿主细胞是在高速率生长（例如，最大生长速率的至少 50%，或至少 60%，至少 70%，至少 80%，至少 90%，至少 95%，至少 98%，至少 99%，或直到最大生长速率）期间在富含碳源的培养基中生长，并在低生长速率（例如低于最大生长速率 90%，或低于 80%，低于 70%，低于 60%，低于 50%，低于 40%，低于 30%，低于 20%，低于 10%，低于 5%，低于 3%，低于 2%，低于 1%，低于 0.5%，低于 0.4%，低于 0.3%，或低于最大生长速率 0.2%）期间产生所述 POI，例如，同时优选地，通过补充限制碳源的基础培养基限制所述碳源。特别地，所述限制碳源的基础培养基不包含诱导转录的碳源。

[0050] 特别地所述 POI 是一种异源蛋白质，优选自治疗性蛋白，包括抗体或其片段，酶和多肽，蛋白抗体，毒素融合蛋白，碳水化合物 - 蛋白质共轭物，结构蛋白，调节蛋白，疫苗和疫苗类蛋白或颗粒，加工酶，生长因子，激素和细胞因子，或 POI 的代谢物，特别地，包括本发明的所述启动子的转录控制下表达感兴趣的基因的重组细胞培养的细胞代谢物。

[0051] 本发明进一步提供从真核细胞识别组成型启动子的方法，包括步骤：

[0052] a) 以高生长速率培养真核细胞；

[0053] b) 以低生长速率进一步培养所述真核细胞；

[0054] c) 提供步骤 a) 和 b) 细胞培养物的样品；

[0055] d) 在所述样品中实施转录分析，并将所述转录水平与所述细胞的天然 pGAP 启动子的转录水平比较；和

[0056] f) 选择与高生长速率和低生长速率的天然 pGAP 启动子比具有更高转录强度的组成型启动子，优选地，通过决定所述经识别的组成型启动子的转录水平进行选择，该启动子的转录水平与所述天然 pGAP 启动子比较至少是 1.1 倍，优选至少是 1.2 倍，优选至少是 1.3 倍，优选至少是 1.4 倍，优选至少是 1.5 倍，优选至少是 1.6 倍，优选至少是 1.7 倍，优选至少是 1.8 倍，优选至少是 1.9 倍，优选至少是 2 倍，优选至少是 3 倍，优选至少是 4 倍，优选至少是 5 倍，优选至少是 10 倍，或至少是 15 倍。

[0057] 特别地，在 $0.01 \sim 0.2 \text{ h}^{-1}$ 范围内，优选 $0.015 \sim 0.15 \text{ h}^{-1}$ 范围的高生长速率和低生长速率下，例如通过检查一种细胞培养物的至少两个样品来确定转录水平，第一个样品代表高生长速率，例如至少 0.05 h^{-1} ，优选至少 0.06 h^{-1} ，或至少 0.07 h^{-1} ，至少 0.08 h^{-1} ，至少 0.09 h^{-1} ，至少 0.1 h^{-1} ，例如，在 0.15 h^{-1} 的生长速率，而第二个样品代表低生长速率，例如，低于第一样品的生长速率，例如，低于 0.05 h^{-1} ，优选地，低于 0.04 h^{-1} ，低于 0.03 h^{-1} 或低于 0.02 h^{-1} ，例如在 0.015 h^{-1} 的生长速率。特别地，例如，根据下述实施例 11，转录水平是通过采用 DNA 芯片分析基因表达模式确定的。

[0058] 本发明进一步提供了包含启动子或由启动子组成的分离的核酸序列的用途，当与

编码 POI 的核苷酸序列可操作的连接时,该启动子指导 POI 在宿主细胞中表达,且表达水平高于高生长速率和低生长速率时的天然 pGAP 启动子控制下的表达水平,优选在一种通过培养采用所述核酸序列转化的宿主细胞产生所述 POI 的方法中的用途,其中,所述培养是在生物反应器中实施,以分批培养期开始,随即为分批补料培养期或连续培养期。

[0059] 特别地,所述表达水平是在 $0.01 \sim 0.2 \text{ h}^{-1}$ 的高和低生长速率范围内,优选在 $0.015 \sim 0.15 \text{ h}^{-1}$ 范围内通过检查一种细胞培养物的至少两个样品确定的,第一个样品代表高生长速率,例如至少 0.05 h^{-1} ,优选至少 0.06 h^{-1} ,或至少 0.07 h^{-1} ,至少 0.08 h^{-1} ,至少 0.09 h^{-1} ,至少 0.1 h^{-1} ,例如,在 0.15 h^{-1} 的生长速率下,而第二个样品代表低生长速率,例如,低于第一样品的生长速率,例如,低于 0.05 h^{-1} ,优选地,低于 0.04 h^{-1} ,低于 0.03 h^{-1} 或低于 0.02 h^{-1} ,例如在 0.015 h^{-1} 的生长速率。特别地,所述表达水平是在生长限制条件下确定的。实施例 10 提供了在生长限制条件下例如在葡萄糖限制的恒化器培养中,在高和低生长速率下确定表达强度的例子。

[0060] 特别地,所述表达水平和所述 pGAP 启动子比较,至少为 1.1 倍,优选地,可至少为 1.2 倍,优选地,至少为 1.3 倍,优选地,至少为 1.4 倍,优选地至少为 1.5 倍,优选地,至少为 1.6 倍,优选地,至少为 1.7 倍,优选地,至少为 1.8 倍,优选地,至少为 1.9 倍,优选地,至少为 2 倍,优选的,至少为倍,优选至少为 4 倍,优选至少为 5 倍,优选至少为 10 倍,或至少为 15 倍。

[0061] 根据一特别的方面,本发明的所述分离的核酸序列或本发明的所述表达构建物可用于通过培养采用所述核酸序列和 / 或表达构建物转化的宿主细胞生产 POI 的方法,优选地,其中,所述培养在生物反应器中实施,从分批培养期开始,随即是分批补料期或连续培养期。

附图说明

[0062] 图 1:毕赤酵母的核酸序列 pCS1 (985bp, SEQ ID 1) 和启动子序列,该启动子序列是包括 pCS1 和在 5' 端的附加核苷酸,或促进 CS1 在毕赤酵母表达的 pCS1 片段的 DNA 序列,包含 1488bp (SEQ ID 2)、767bp (SEQ ID 3)、500bp (SEQ ID 4)、344bp (SEQ ID 5)、234bp (SEQ ID 6)、138bp (SEQ ID 7) 和 85bp (SEQ ID 8)。

[0063] 图 2:以下菌株的 CS1 编码核苷酸序列和氨基酸序列

[0064] i) 菌株 GS115, CBS7435 和 CBS2612 (PAS_chr1-4_0586), 编码序列 (SEQ ID 9), 翻译序列 (XM_002490678.1, SEQ ID 10); 和

[0065] ii) 菌株 DSMZ70382 (PIPA02805), 编码序列 (SEQ ID 11), 翻译序列 (SEQ ID 12)。

[0066] 图 3:毕赤酵母 (GS115) 的天然 pGAP 启动子序列 (SEQ ID 13)。

具体实施方式

[0067] 说明书全文使用的特定术语具有下列含义:

[0068] 本文所用术语“碳源”或“碳源物”指的是一种发酵碳源物,典型的,指一种适合作为微生物能源的源碳水化合物,例如,可被宿主微生物或生产细胞系代谢的碳源,特别是选自由单糖、寡糖、多糖,包括甘油的醇类组成的组的碳源,为纯化形式,在基础培养基中,或

在原材料中提供,例如一种复合营养物质。根据本发明,该碳源可用做单一碳源或作为不同碳源的混合物。

[0069] 本文所用术语“碳源丰富条件”特别指的是适合细胞生长的碳源例如适合真核细胞生长的营养物质的类型和数量。该碳源可以培养基,例如基础培养基或复合培养基,但也可在包含纯化的碳源的(化学)限制性培养基的方式提供。

[0070] 本文用于细胞培养过程的生长期的碳源以称为“基础碳源”,并且通常以适于提供细胞生长的量提供,例如获得至少为 5g/L 的细胞干物质量,优选地,至少 10g/L 的细胞干物质量,至少 15g/L 的细胞干物质量的细胞密度,例如在标准次级培养步骤期间,表现超过 90% 的,优选超过 95% 的活力。

[0071] 在生长期,所述碳源通常过量或有剩余地使用,这通常可理解为例如培养高的特定生长速率的细胞期间,过量提供能量以提高生物量。

[0072] 特别地,该剩余量超过生长限制条件下使用的碳源的限制数量,以在发酵液中获得过剩浓度,该过剩浓度是可测量的,并且通常比采用包含限制性碳源底物的培养基培养细胞获得的浓度至少高 10 倍,优选地,至少高 50 倍或至少高 100 倍。

[0073] 本发明术语“碳源限制的条件”或“限制性碳源”也指“补充碳源”,例如,根据本发明的使用可理解为有利于通过生产细胞系而生产发酵产品的碳源的类型和数量,尤其是在低于最大生长速率的受控生长速率的培养过程中。特别地,生长期例如分批培养期,分批补料培养和连续培养过程后接着是生产期。

[0074] 总之,细胞培养过程可分为分批培养、连续培养和分批补料培养。分批培养是这样的培养过程,通过该过程将少量的种子培养液添加到培养基,而细胞生长时不添加补料或在培养期间不排出培养液。连续培养是这样的培养过程,通过该过程,在培养期间,连续添加和排出培养基。连续培养也包括灌流培养。分批补料培养,是介于分批培养和连续培养之间的一种中间方式,也称为半分批培养,它是这样的培养过程,通过该过程,在培养期间,不断地或连续添加培养基,但与连续培养不同,培养液不是连续排出。

[0075] 特别优选的是一种以向培养液中补加生长限制因子为基础的分批补料方法。该分批补料方案,包括单独的分批补料和重复的分批补料发酵,典型地用于生物产业工艺从而在生物反应器中实现高细胞密度。碳源的控制性添加直接影响培养物的生长,并有助于避免溢出代谢或形成不需要的代谢副产物。在限制碳源的条件下,特别地,碳源盛装于分批补料培养过程的补料中。因此,碳源的提供量是受到限制的。

[0076] 在本发明所述恒化器或连续培养中,生长速率可得到严格控制。

[0077] 本发明中,碳源的“限制性量”可理解为保持细胞系处于生长限制条件下,例如在生长期或在生产模式中必需的碳源的数量。这样的限制性数量可用于分批补料培养过程,在这里,碳源包含于补料培养基中,低速流加到培养液中以维持能量供应,例如,产生 POI,同时保持生物量处于低的特定生长速率。典型地,补料培养基是在细胞培养的生产期添加到发酵液中。

[0078] 例如,碳源的限制性数量可以由细胞培养液中碳源的残留量决定,低于预定的阈值或甚至低于标准(碳水化合物)检测法测量得到的检测限。典型地,该残留量在经过收获发酵产品的发酵液中确定。

[0079] 碳源的限制性数量也可通过限制向发酵罐添加碳源的平均补料速率确定,例如由

向整个培养过程例如每次发酵时间的分批-补料期添加的数量决定,来决定计算得出的每次添加(碳源)的平均数量。该平均补料速率保持低值,以便保证细胞培养物充分利用补充的碳源,例如,在 $0.6\text{g/L}^1\text{h}^{-1}$ (g 碳源/ L 初始发酵体积, h 时间) 和 $25\text{g/L}^1\text{h}^{-1}$, 优选介于 $1.6\text{g/L}^1\text{h}^{-1}$ – $20\text{g/L}^1\text{h}^{-1}$ 。

[0080] 该碳源的限制性数量也可以通过特定生长速率确定,在生产期间,其特定生长速率保持低速,如低于最大特定生长速率,例如在预先确定的范围内,例如在 0.001h^{-1} – 0.20h^{-1} , 或 0.02h^{-1} – 0.20h^{-1} , 优选 0.02h^{-1} 或 $\sim 0.15\text{h}^{-1}$ 。

[0081] 可使用任意类型的适合用于真核细胞培养的有机碳源。根据一特定实施方式,所述碳源是己糖,例如葡萄糖,果糖,半乳糖或甘露糖,二糖例如蔗糖,醇类例如甘油或乙醇或其混合物。

[0082] 根据一特别优选的实施方式,所述基础碳源选自由葡萄糖、甘油、乙醇或其混合物和复合营养物质组成的组。根据一优选的实施方式,所述基础碳源是甘油。

[0083] 根据一进一步的特别实施方式,一种补充碳源是己糖,例如葡萄糖、果糖、半乳糖和甘露糖,二糖,如蔗糖,醇类,如甘油、乙醇、或其混合物。根据一优选的实施方式,所述补充碳源是葡萄糖。

[0084] 特别地,所述方法可采用甘油作为基础碳源,葡萄糖作为补充碳源。

[0085] 特别地,本发明所用的一种补料培养基是化学成分明确和无甲醇的。

[0086] 关于细胞培养基,例如分批-补料工艺中的基础培养基或补料培养基,术语“化学成分确定的”或“确定的”指的是适合生产细胞系的体外细胞培养的培养基,其中,全部化学成分和(多)肽类是已知的。典型的,化学成分确定的培养基是完全没有动物来源的成分,并且代表纯净的始终如一的细胞培养环境。

[0087] 本发明所用术语“细胞系”指的是已经建立的获得了长时间增殖能力的特定细胞类型的克隆。术语“宿主细胞系”指的是用于表达内源或重组基因或代谢途径的产物以产生多肽或这种多肽调节的代谢物的细胞系。“生产宿主细胞系”或“生产细胞系”通常可理解为可随时用于生物反应器中培养以获得生产过程的产品,例如 POI 的细胞系。术语“真核宿主”或“真核细胞系”指的是任何可培养产生 POI 或宿主细胞代谢物的真核细胞或生物。众所周知,本发明的术语不包括人类。

[0088] 根据特别优选的本发明的真核宿主细胞,所述细胞或细胞系选自由哺乳动物、昆虫、酵母、丝状真菌和植物细胞系组成的组,优选酵母。

[0089] 特别地,所述酵母选自由毕赤酵母属、假丝酵母属、球拟酵母属、陆地酵母、汉逊酵母属、耶氏酵母属、克鲁维酵母菌属、酵母属、毕赤酵母属 (*Komagataella*), 优选甲烷营养型酵母。

[0090] 特别优选的酵母菌是毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)、毕赤酵母 (*Komagataella pastoris*)、毕赤酵母 (*K. phaffii*) 或毕赤酵母 (*K. pseudopastoris*)。

[0091] 关于宿主细胞系,术语“细胞培养”或“培养”也称为“发酵”,指的是在人工的,例如体外环境下,在有利于生长、分化或持久活性的条件下,特别是,维持细胞在控制的生物反应器中,根据工业上的已知方法,保持细胞活力或静止状态。

[0092] 当采用本发明的培养基培养细胞时,在培养容器中,将所述细胞培养物与培养基接触或在适于支持细胞培养的条件下与底物接触。在特定的实施方式中,本发明所述培养

基用于根据本领域公知的标准细胞培养技术培养细胞。在本发明的不同方面,提供的培养基可用于真核细胞特别是酵母或丝状真菌的生长。

[0093] 细胞培养基可以提供在可控的、人工的和体外的环境维持和使细胞生长必需的营养物。细培养基特性和化学成分随着特定的细胞需要而发生变化。重要参数包括摩尔渗透压浓度、pH 值营养液配方。根据现有技术公知方法,营养物可以采取连续或不连续模式流加。本发明使用的培养基对于生产重组蛋白尤其有用。

[0094] 而分批工艺是一种培养模式,在其中,细胞培养所需的所有营养物包含于最初的培养基中,在发酵期间中,在分批补料过程中,没有另外供应进一步的营养物质,分批期后,补料期开始,这期间,通过补料将一种或更多的营养物提供给培养基。营养物补料的目的是提高生物量,以便也提高重组蛋白数量。尽管在大多数培养工艺中,补料模式及其关键和重要,采用本发明启动子的本发明并不受特定培养模式的限制。

[0095] 在本发明的某些实施方式中,采用的方法是分批补料方法。特别地,采用编码期望得到的 POI 的核酸构建物转化的宿主细胞在生长期培养基中培养,并转移到生产期培养基以便产生期望得到的重组 POI。

[0096] 补料培养基添加到培养液可以采用液体形式或其他替代形式,比如固体(例如药片或其他缓释方法)或气体(例如二氧化碳)。但是,根据一优选的实施方式,添加到细胞培养基的补充碳源的限制性数量甚至可以是 0。优选地,在限制碳源的条件下,所述在培养基中的补充碳源的浓度是 0 ~ 1g/L,优选低于 0.6g/L,更优选低于 0.3g/L,更优选低于 0.1g/L,优选 1 ~ 50mg/L,更优选 1 ~ 10mg/L,特别优选 1mg/L 甚至更低,例如低于采用合适的标准检测方法测定的检测限,例如测定为在培养基中生长细胞培养消耗后的残留浓度。

[0097] 在一优选方法中,碳源的限制数量决定了细胞培养中的残留量低于生产末期或发酵过程的输出期,优选收获发酵产物后在发酵培养液中确定的检测限。

[0098] 优选地,补充碳源的限制数量是生长限制性的,从而维持特定的生长速率低于最大特定生长速率,例如在 0.001h^{-1} ~ 0.20h^{-1} , 或 0.02h^{-1} ~ 0.20h^{-1} , 优选 0.02h^{-1} ~ 0.15h^{-1} 范围内。

[0099] 在另一实施方式中,本发明的宿主细胞以连续方式(例如恒化器)培养。连续发酵工艺的特征是以确定的、恒定的和连续的速率的补充新培养基到生物反应器中,借此,同时以限制的、恒定的和连续速率从生物反应器中移除培养液。通过维持培养基,补料速率和移除速率处于相同的恒定水平,生物反应器的培养参数和条件也维持恒定。

[0100] 特别地,本发明所述的稳定细胞可理解为指的是甚至培养 20 代后,优选至少 30 代,更优选 40 代,最优选 50 代后,维持遗传特性,特别是保持 POI 产量在高水平的细胞培养物。特别地,提供了用于工业规模生产时视为最具优势的稳定的重组宿主细胞系。

[0101] 本发明的所述细胞培养技术(例如,有效体积和技术系统)与在营养物补料为基础的培养模式,特别是分批补料培养或分批培养工艺,或连续或半连续工艺(例如恒化器)的结合,对于工业生产规模的方法特别有利。

[0102] 术语“表达”或“表达系统”或“表达盒”指的是包含期望的编码序列和控制序列的可操作的连接的核酸分子,因此,采用这些序列转化或转染产生的宿主可产生编码蛋白或宿主代谢物。为了实现转化,所述表达系统可进入载体中;但是所述有关 DNA 也可整合到宿主染色体中。表达可适用于分泌的或非分泌的表达产物,包括多肽或代谢物。

[0103] 本发明使用的“表达构建物”或“载体”或“质粒”确定为克隆的重组核苷酸序列转录,例如重组基因的转录和其 mRNA 在适当的宿主生物中的翻译所需的 DNA 序列。表达载体或质粒通常包含在细胞中的自主复制的起始点,选择标记(例如氨基酸合成基因或对抗生素(例如博来霉素、卡那霉素,G418 或潮霉素)具有抗性的基因),多种限制性内切酶位点,一种适当的启动子序列和一种转录终止子,这些组件是可操作的连接在一起的。本发明所用术语“质粒”和“载体”包括自主复制核酸序列,也包括基因组整合的核酸序列。

[0104] 特别地,本发明的表达构建物包含本发明的在所述启动子转录控制下与编码 POI 的核苷酸序列可操作的连接的启动子,该启动子与 POI 的编码序列不是天然相关的。

[0105] 本发明使用的关于核苷酸或蛋白的术语“异源”指的是一种既可以是对于给定宿主细胞是外来的,例如“外源的”,如不是天然发现的,或是在给定的宿主细胞中天然发现的,例如“内源的”,但是,在异源构建物的背景中,例如采用异源核酸时,是“外源的”。内源性发现的异源核苷酸也可以非天然产生的,例如大于预期的或者大于天然发现的细胞内的数量。所述异源核苷酸序列或包含所述异源核苷酸序列的核酸,可能与内源核苷酸序列不同,但编码与内源发现的相同蛋白。特别地,异源核苷酸序列是那些未发现与宿主细胞有本质上相同关系的异源核苷酸序列。任何重组或人工核苷酸都可理解为异源的。如本发明所述,根据本发明,异源多核苷酸的一个例子是例如为得到杂合启动子,或可操作的连接到一个编码序列与启动子非天然关联的核苷酸序列。结果,可得到一个杂合或嵌合的多核苷酸。异源化合物的一个进一步的实施例是可操作的连接到转录控制元件,如本发明的启动子的 POI 编码多核苷酸,内源的天然存在的 POI 编码序列与该启动子通常不是可操作的连接的。

[0106] 在本发明的上下文中,术语“变种”特别指的是源自亲本序列,例如,通过长度变异,例如延长或断裂、突变、杂交(包括序列结合),或具有特别程度的同源性,或类似获得的任何序列。

[0107] 本发明特别提供一种启动子,它是一种野生型启动子,例如,毕赤酵母的,或一种具有其功能活性的变种,例如,能控制野生型或重组真核细胞的特定基因的转录。

[0108] 本发明的上下文中使用的术语“天然的”特别指的是生物的一种个体结构或组分,其与环境天然相关。但是,众所周知,天然结构或组分可从天然相关的环境分离,并且可作为分离的天然结构或组分。这样分离的天然结构或组分也可以是人工的或合成起源,并且仍然具有与天然起源相同的特征。

[0109] 尽管本发明的某些实施方式指的是天然结构或组分,例如分离形式的,众所周知,本发明的材料、方法和用途,例如,特别指的是分离的核酸序列,氨基酸序列,表达构建物,转化的宿主细胞和重组蛋白是“人造的”,并且因此,不视为“自然法则”结果。

[0110] 所述有功能活性的变种启动子,例如源自通过突变产生的启动子序列 pCS1 (SEQ ID 1),从而采用该 pCS1 序列作为“亲本”序列,以产生适合作为重组细胞系的启动子的序列。通过选择具有预先确定的特性的库成员,这样的变种启动子可源自一突变体序列的(pCS1)库。变种启动子可具有相同的甚至改善的特性,例如,改善了支持 POI 生产的启动子强度,在高生长速率和低生长速率仍然保持实质上相同的启动子功能和强度,在本文特别理解为“生长速率依赖性功能”。

[0111] 所述变种启动子也可源自类似的序列,例如源自毕赤酵母之外的真核种,或源自毕赤酵母属之外的属(例如源自 *K. lactis*, *Z. rouxii*, *P. stipitis*, *H. polymorpha*)。特别

地,所述和对应的毕赤酵母基因的类似基因天然关联的类似启动子序列可用作该序列或用作亲本序列产生其有功能活性的变种。特别地,类似 pCS1 的启动子特征是,它是天然与类似 CS1 的基因关联的(参见氨基酸序列 SEQ ID 9 或 11),这样的类似启动子序列或其有功能活性的变种的特性可采用标准技术确定。

[0112] 特别地,本发明所用的核苷酸或启动子序列的“有功能活性”变种指的是一种例如由通过在该序列内部或在该序列一端或两端插入,删除或替换序列中的一个或多个核苷酸修饰产生的突变体序列,并且该修饰不影响(特别是损害)该序列的活性。

[0113] 特别地,本发明所述启动子序列的有功能活性的变种选自由下列序列组成的组:

[0114] ——具有与亲本序列至少 60% 的核苷酸序列一致性,优选至少 70%,至少 80%,或至少 90% 同源度或序列一致性的同源序列;和/或

[0115] ——通过修饰亲本核苷酸序列,例如 pCS1 序列或其长度变体获得的同源物,该长度变体可作为模板提供突变,例如通过在序列内或在序列的一个或两个末端插入、删除或替换一个或多个核苷酸,该同源物优选具有(即包含或由其组成)80bp ~ 1500bp 或 200bp ~ 1500bp 或 234bp ~ 1488bp,优选至少 100bp,至少 200bp,优选至少 300bp,更优选至少 400bp,至少 500bp,至少 600bp,至少 700bp,至少 800bp,至少 900bp,或至少 1000bp 的核苷酸序列,和

[0116] ——源自毕赤酵母以外的其他种的类似物。

[0117] 特别地,优选的有功能活性的变种是源自本发明启动子的那些,其通过修饰、延伸获得,和/或者是该启动子的多个片段,具有的(即包含或由其组成)核苷酸序列为至少 80bp,优选至少 100bp,优选至少 200bp,优选至少 250bp,优选至少 300bp,更优选至少 400bp,至少 500bp,至少 600bp,至少 700bp,至少 800bp,至少 900bp,或至少 1000bp,优选直到 1500bp。

[0118] 特别地,本发明所述的亲本启动子序列的有功能活性的变种可通过突变产生。本发明上下文所用术语“突变产生”指的是一种提供核苷酸序列突变体的方法,例如通过插入,删除和/或替换一个或多个核苷酸,从而获得具有非编码或编码区至少一个改变的其变种。突变可通过随机的,半随机的或位点定向突变形成。典型地,大型的随机基因库是通过高度基因多样性产生,可根据特别期望的基因或基因表型选择该基因多样性。

[0119] 本发明所述启动子的某些优选的有功能活性的变种是长度变种,或特别是 pCS1 片段,优选那些包含启动子核苷酸序列的 3' 端,例如源自具有特别长度和 5' 端插入或删除,例如 5' 端的核苷酸序列延伸或截止的一种启动子核苷酸序列的核苷酸序列,从而得到具有范围从 3' 到变化的 5' 端的特定长度,例如,核苷酸序列长度至少为 80bp,优选至少为 100bp,优选至少 200bp,优选至少 250bp,优选至少 300bp,更优选至少 400bp,至少 500bp,至少 600bp,至少 700bp,至少 800bp,至少 900bp,或至少为 1000bp 的。

[0120] 本发明的延长的长度变种优选在所述 pCS1 序列,例如那些与在细胞复制起点的野生型 pCS1 序列天然关联的 pCS1 序列的 5' 端包含另外的一个或多个核苷酸。

[0121] 例如,pCS1 的一个有功能活性的变种可包含一核苷酸序列,或由选自由 pCS1a(SEQ ID 2)、pCS1b(SEQ ID 3)、pCS1c(SEQ ID 4)、pCS1d(SEQ ID 5)、pCS1e(SEQ ID 6)、pCS1f(SEQ ID 7)、和 pCS1g(SEQ ID 8) 组成的组的核苷酸序列组成,因而,包含一个长度范围为 80 ~ 1500bp 的核苷酸序列。优选地,所述 pCS1 的有功能活性变种包含选自自由

pCS1a(SEQ ID 2)、pCS1b(SEQ ID 3)、pCS1c(SEQ ID 4)、pCS1d(SEQ ID 5) 及 pCS1e(SEQ ID 6) 组成的组的核苷酸序列或由这些序列组成。

[0122] 本发明的启动子的有功能活性的变种也可理解为包含所述 pCS1 的杂合序列及其任一种有功能活性变种,特别是任何亲本的长度变种或片段序列,例如,与任一称为 pCS1 或其有功能活性变种的序列中的一个或多个结合产生,例如至少两个这种亲本序列,至少 3 个,至少 4 个,或至少 5 个这种亲本序列,例如,两个或多个 pCS1 延伸序列或选自由 pCS1a、pCS1b、pCS1c、pCS1d、pCS1e、pCS1f 及 pCS1g 组成的组的片段,优选地,选自由 pCS1a、pCS1b、pCS1c、pCS1d 及 pCS1e 组成的组的片段的结合。在另一实施方式中,所述杂合是由至少一个选自 pCS1 或其任一有功能活性的变种的序列,特别是任一长度变种或片段序列,和例如与毕赤酵母的 pCS1 序列非天然关联的异源序列组成。

[0123] 所述本发明启动子的有功能活性变种可进一步理解为包含在严谨条件下与所述 pCS1 启动子或其有功能活性的长度变种或片段杂交的核苷酸序列,突变体或其杂合核酸序列中的任一种杂交的核苷酸序列。

[0124] 如本发明使用的,术语“杂交”或“杂交”指的是这样的过程,在期间,两个核酸序列在适当的条件下彼此退火,具有稳定的特定氢键从而形成双链。两个互补序列或充分互补的序列的杂交取决于使用的操作条件,特别是严谨性。所述严谨性可理解为表示同源性;严谨性越高,序列间的同源百分度越高。该严谨性可特别定义为两个核酸序列的碱基组成,和/或两个核酸序列之间的错配度。通过变换条件,例如,盐浓度和温度,可实现给定的核酸序列仅仅与准确互补序列杂交(高度严谨性)或与任何相关序列杂交(低严谨性)。提高温度或降低盐浓度可趋于提高杂交反应的选择性。

[0125] 如本发明所使用的术语“在严谨杂交条件下杂交”优选理解为指的是在某种严谨条件下杂交。在一优选的实施方式中,所述“严谨杂交条件”是这样的条件,两个核酸序列的同源性至少为 70%,优选至少为 80%,优选至少为 90%,即只有在杂交期间获得的双链包含优选至少 70%,优选至少 80%,优选至少 90%的 A-T 键和 C-G 键时,杂交才可能进行。

[0126] 所述严谨条件取决于反应参数,比如杂交溶液中存在的离子浓度和类型,变性剂的性质和浓度和/或杂交温度。如本领域熟练技术人员可按照 Sambrook 等人(《分子克隆(Molecular Cloning)》:实验手册,Cold Spring Harbor,1989)所述确定合适的条件。

[0127] 特别地,通过展现与 pCS1 实质相同的活性,可确定本发明的有功能的活性变种的特征。

[0128] 本发明所用的术语“实质相同的活性”特别指的是指明的实质相同或改善的启动子强度,特别是启动子的表达或转录强度,以及和启动子强度相关,特别是确定的不依赖于宿主细胞的生长速率的实质相同的或改善的特性,如按照采用合适的测试系统确定的表达或转录强度与 pCS1 实质相同,例如,±20%或±10%,和/或高于天然的宿主细胞的天然 pGAP 启动子,例如,相对于 pGAP 启动子强度至少 1.1 倍的升高,或至少 1.2 倍优选至少 1.3 倍,优选至少 1.4 倍,优选至少 1.5 倍,优选至少 1.6 倍,至少优选 1.7 倍,至少优选 1.8 倍,至少优选 1.9 倍,和至少优选 2.0 倍升高,甚至更高,例如,至少 3 倍,至少 4 倍,至少 5 倍,至少 10 倍,或至少高达 15 倍的活性,该特性改善采用合适的测试系统确定,该测试系统采用相同的宿主细胞类型,相同的培养条件和相同的编码表达产物例如 POI 的核酸。

[0129] 术语“同源性”指的是两个或多个核苷酸序列在相应的位置具有相同的或到某一

程度,直到接近 100%的程度保守的碱基对。本发明的一种同源序列典型地具有至少 60%的核苷酸一致性,优选至少 70%一致性,更优选至少 80%一致性,更优选至少 90%一致性,更优选至少 95%一致性,更优选 98%或 99%一致性。

[0130] 优选地,本发明的同源启动子序列至少在核苷酸序列的特定部分,优选与毕赤酵母的 pCS1、pCS1a、pCS1b、pCS1c、pCS1d、pCS1e、pCS1f 和 pCS1g 启动子核苷酸序列的任一项和源自毕赤酵母之外的其他种的类似物具有某种同源性。例如包括个别启动子核苷酸序列的 3' 的部分,优选具有长度到达个别启动子核苷酸序列的 3' 的特定长度的一部分,例如长度为 80bp ~ 1500bp,优选 200bp ~ 1500bp,更优选 234bp ~ 1488bp,优选至少 100bp,优选至少 200bp,优选至少 300bp,优选至少 400bp,优选至少 500bp,优选至少 600bp,优选至少 700bp,优选至少 800bp,优选至少 900b 或至少 1000bp 的部分。特别地,至少那些部分优选在包括个别启动子核苷酸序列的 3' 末端序列的 300 ~ 1000bp 范围内同源。

[0131] 类似的序列典型地源自其他种或菌株。从表达上可理解为,本发明的任一源自毕赤酵母之外的其他种的类似启动子序列可包含同源序列,例如具有本发明所述某种同源性的序列。因此术语“同源的”也可包括类似序列。另一方面,可理解为,本发明也指包含某种同源性的类似序列和其同源序列。

[0132] 关于基因的核苷酸序列的“同源性百分比”定义为在序列比对和引进 gap 后,如必要,获得最大的百分序列一致性,而不将任何保守的替换视为序列一致性的部分时,候选 DNA 序列的核苷酸百分比,该序列与所述 DNA 序列的核苷酸相同。为确定百分核苷酸序列一致性进行的序列比对可通过本领域熟练技术人员掌握的方法例如采用可公共获得的计算机软件实施。本领域熟练技术人员可确定用于测定比对的合适参数,包括获得进行比较的序列的全长的最大对齐必须的任何算法。

[0133] 本发明所用的与核酸,POI 或其他化合物相关的术语“分离的”或“分离”指的是这样的化合物,它被充分地从与其天然相关的环境中分离,以便以“实质上纯净”的形式存在。“分离的”不一定指人工排除或与其他化合物或材料合成的混合物,或以及例如,由于未完全纯化而存在的杂质不干扰基本活性。特别地,本发明的分离的核酸分子也指包括那些化学合成的核酸分子。关于本发明的核酸,有时使用术语“分离的核酸”或“分离的核酸序列”。适用于 DNA 时,该术语指的是从序列中分离的 DNA 分子,在天然存在的其起源的生物的基因组中,该 DNA 分子与该序列是最靠近的。例如,一种“分离的核酸”可包含插入到一种载体的 DNA 分子,比如质粒或病毒载体,或整合到原核细胞或真核细胞或宿主微生物的基因组 DNA 的序列。特别地,根据本发明,术语“分离的核酸”排除与编码 CS1 蛋白的核酸序列连接的 pCS1 序列。一种“分离的核酸”(也包括 DNA 或 RNA)可进一步代表通过生物学的或合成的方法直接产生的和生产期间从存在的其他组件中分离的分子。

[0134] 本发明所用术语“可操作的连接”指的是单一核酸分子上例如载体的核苷酸序列以这样的方式的连接,其中一个或多个核苷酸序列受到存在于所述核酸分子的至少一个其他的核苷酸序列影响。例如,当能够实现编码序列的表达时,一个启动子与一重组基因的编码序列可操作的连接。做为进一步的实施例,当能够表达分泌形式的蛋白比如一种成熟蛋白的前体或成熟蛋白时,一个编码单一肽的核酸与编码 POI 的核酸序列可操作的连接。特别地,这种互相操作性连接的核酸可直接连接,即在编码信号肽的核酸和编码 POI 的核酸之间无进一步的元件或核酸序列。

[0135] 本发明所用的术语“启动子”指的是能够控制编码序列或有功能的 RNA 的表达的 DNA 序列。启动子活性可通过转录效率测定。该活性可通过测定从启动子转录的 mRNA 的量例如通过 Northern 杂交直接确定,或间接通过测定从启动子表达的基因产品的量来测量。

[0136] 本发明的启动子可特别地启动,调控或相反介导或控制编码 DNA 的表达。启动子 DNA 和编码 DNA 可来自同一基因或来自不同基因,可来自相同的或不同的生物。

[0137] 特别地,本发明的启动子可理解为一种例如,不需要诱导或不可能阻遏性控制表达的组成型启动子。因此,在一定水平上具有持续和稳定的表达。由于宿主细胞在所有生长期和生长速率的高启动子强度具有唯一功能,本发明的组成型启动子对于宿主细胞系的分批补料培养特别有用。现有技术的组成型启动子具有在生长限制条件下,例如分批补料工艺中强度低的实施方式的弊端,或用于宿主细胞维持在高生长速率例如中间对数期。

[0138] 本发明的启动子强度特别指转录强度,由以高或低频率发生在启动子中的转录启动的效率表示。转录强度越高,启动子的转录频率越大。由于可以决定给定 mRNA 序列有效转录的频率,给予某些基因比其他基因更高的转录优先性,产生更高的转录浓度,启动子强度相当重要。例如,编码大量需要的蛋白的基因,通常具有相当强的启动子。RNA 聚合酶在一段时间只能执行一次转录,因此,必须使其效率优先。可选择通过启动子强度的差异实现该优先性。根据本发明,比如,在细胞培养的高生长速率和低生长速率两种情况,不依赖宿主细胞的代谢或生长率,并特别不依赖于碳源,表现一种关于最大活性特别是恒定水平的状态,则所述启动子相当强。

[0139] 相关强度通常根据标准启动子,例如作为宿主细胞使用的细胞的具体 pGAP 启动子确定。转录频率通常理解为转录速率,例如,通过采用合适的分析方法,例如 RT-PCR 或 Northern 印迹确定。表达感兴趣的基因的启动子强度通常理解为表达强度或支持高表达水平/速率的能力。例如,可在宿主细胞中(其为毕赤酵母)中确定本发明的启动子的表达和/或转录强度,并与毕赤酵母的天然 pGAP 启动子比较。

[0140] 可通过基因芯片测定的转录强度或采用实时定量 PCR(qRT-PCR) 确定转录速率,在这里,基因芯片或 qRT-PCR 数据显示了和天然 pGAP 启动子比较的高生长速率的条件和低生长速率的条件,或采用差异培养基组分的条件的表达水平的差异和高信号强度。以下的实施例 11 特别描述了合适的测试系统。

[0141] 与宿主细胞中的天然 pGAP 启动子,有时称为“同源 pGAP 启动子”比较,至少 110% 的转录速率或转录强度反映,本发明的启动子发挥了相当高的转录强度。优选地,例如,与天然 pGAP 启动子比较,例如在选作为生产 POI 的宿主细胞确定的,比如,在碳源丰富的条件下如分批培养确定的,或例如碳源限制的条件下例如恒化器或分批补料培养确定的转录速率或转录强度至少为 110%,优选为至少 120%,或至少 130%,至少 160%,至少 170%,至少 180%,至少 190%,至少 200%,至少 3 倍,至少 4 倍,至少大约 5 倍,至少大约 10 倍,至少大约 15 倍,或甚至更高。

[0142] 优选地,所述转录分析是优选采用 qRT-PCR、DNA 芯片, RNA 测序和转录组分析定量或半定量。

[0143] 例如,所述表达速率可以通过报告基因例如以下实施例部分所述的 GFP 的表达量确定,测试系统特别地在实施例 10 描述。通过在溶液中培养克隆与天然 pGAP 启动子比较,结果表明, pCS1 启动子具有相当高(至少为 110%)的转录速率。

[0144] 感兴趣的基因的表达水平反映,本发明的启动子发挥相当高的表达强度,与有时称为“同源启动子”的宿主细胞中的天然 pGAP 启动子比较,该强度至少是 110%。优选地,例如,在选择作为产生 POI 的宿主细胞的真核细胞中确定,比如在碳源丰富的条件下例如分批培养确定或在碳源限制的条件下例如恒化器或分批补料培养确定,与天然 pGAP 启动子比较,表达强度至少为 110%,优选至少为 120%,或至少为 130%,至少为 140%,至少为 150%,至少为 160%,至少为 170%,至少为 180%,至少为 190%,至少为 200%,至少为 3 倍,至少为 4 倍,至少为 5 倍,至少为 10 倍,至少为 15 倍,甚至更高。

[0145] 天然 pGAP 启动子启动编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 Gap 基因 (GAPDH),它是一个在大多数活性微生物中存在的组成型启动子。GAPDH (EC 1\2\1\12),一种糖酵解和糖异生的关键酶,在糖类的分解代谢和合成代谢中发挥关键作用。因此,所述 pGAP 启动子,虽然理解为组成型(例如不能通过补充特别碳源诱导)启动子,但是一种随生长速率提高而发挥更高启动子强度的代谢型启动子。因此,低生长率期间细胞系培养过程中,所述 pGAP 启动子几乎不适合有效生产过程。

[0146] 相反,本发明的启动子在宿主细胞培养的全部生长时期令人惊讶地维持其高启动子强度(基本上)处于恒定的高转录水平。

[0147] 特别地,所述天然 pGAP 启动子以在同种或同菌株中的天然真核细胞包括未修饰的(非重组的)或重组的真核细胞中相似的方式在重组真核细胞中具有活性。因此这种天然 pGAP 启动子通常可理解为,与真核细胞同源,作为比较目的的标准或参考启动子的一种内源启动子。

[0148] 例如,毕赤酵母的一种天然 pGAP 启动子是如用于控制毕赤酵母中 GAPDH 的表达的毕赤酵母的未修饰的内源启动子序列,例如,具有图 3 所示的序列:毕赤酵母的天然 pGAP 启动子序列 (GS115) (SEQ ID 13)。根据本发明,如果毕赤酵母 (*P. pastoris*) 用于作为生产 POI 的宿主,将根据本发明的启动子转录强度或转录速率与毕赤酵母的这种天然 GAP 启动子比较。

[0149] 作为另一实施例,如在啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的表达控制中使用的,啤酒酵母的一种天然 pGAP 启动子是未修饰的啤酒酵母内源启动子序列。根据本发明如果啤酒酵母用于作为生产 POI 的宿主,将根据本发明的启动子转录强度或转录速率与啤酒酵母这种天然 pGAP 启动子比较。

[0150] 因此,本发明的启动子的相关表达或转录强度通常与用于作为生产 POI 的宿主的同种或菌株的细胞的天然 pGAP 启动子比较。

[0151] 特别地,可以理解为,本发明的启动子优选为非代谢启动子,比如,与一基因天然可操作的连接的启动子,该基因编码充分糖酵解酶或糖异生酶,一种核糖体蛋白或一种酶例如胞内蛋白酶或从宿主细胞分泌的蛋白酶的。

[0152] 特别优选地是本发明的一种启动子,其具有至少为 pCS1 的表达强度或转录强度。可通过标准方法,例如通过测定表达产品的量或转录量,例如采用基因芯片, Northern 印迹、RNA 测序或 qRT-PCR, 采或其他在细胞培养中的方法例如通过测量在重组细胞中个别基因表达产物的量,用 pGAP 启动子作为参考测定比较的启动子强度。实施例部分解释了实验例测定。

[0153] 本发明所用术语“感兴趣的蛋白 (POI)”指的是通过在宿主细胞中的重组技术生

产的多肽或蛋白。更特别地,所述蛋白既可以是一种非天然存在于宿主细胞的多肽,即一种宿主细胞的同源蛋白,或例如,通过采用包含编码 POI 的核酸序列的自我复制的载体转化,或通过重组技术整合编码 POI 的核酸序列的一个或多个拷贝到宿主细胞的基因组,或通过重组修饰控制编码所述 POI 的基因的表达式的一个或多个调节序列,例如启动子序列来产生的。在某些实例中,本发明使用的术语 POI 也指任何由重组表达的蛋白调节的宿主细胞的代谢产品。

[0154] 根据一特别实施方式,特别是,如果本发明的该启动子与任一编码 CS1 蛋白的核酸序列天然相关,术语 POI 将不包括毕赤酵母的 CS1 蛋白,例如,通过图 2 的任何氨基酸序列确定特征。

[0155] 特别地,本发明所述 POI 是一种真核蛋白,优选一种哺乳动物蛋白,特别是一种宿主细胞的异源蛋白。

[0156] 根据本发明产生的 POI 可以是寡聚体蛋白质,优选二聚体或四聚体。

[0157] 根据本发明的一方面,所述 POI 是一种重组或异源蛋白,优选选自治疗性蛋白,包括抗体或其片段,酶和多肽,蛋白抗体,毒素融合蛋白,碳水化合物-蛋白结合物,结构蛋白,调节蛋白,疫苗和疫苗类蛋白或颗粒,加工酶,生长因子,激素和细胞因子,或 POI 的代谢物。

[0158] 一种特异性的 POI 是一种结合分子例如抗体或其片段的抗原。在特异性的 POI 中,抗体是例如单克隆抗体 (mAbs)、免疫球蛋白 (Ig) 或 G 类免疫球蛋白 (IgG),重链抗体 (HcAb's),或其片段,如抗原结合片段 (Fab),Fd,单链变异片段 (scFv),或工程制备的其变种比如 Fv 二聚体 (双抗体),Fv 三聚体 (三抗体),Fv 四体 (四抗体)或微抗体,或单域抗体类 VH 或 VHH 或 V-NAR。

[0159] 根据一特别实施方式,一种发酵产品是采用 POI,一种代谢物或一种其衍生物生产。

[0160] 所述 POI 可特别地从细胞培养物分离成纯化形式,例如实质上为纯净的。

[0161] 本发明所用术语“实质上纯净的”或“纯净的”指的如是一种包含至少 50% 质量百分比,优选至少 60%、70%、80%、90% 或 95% 的化合物,如核酸分子或 POI。纯度是通过适合于所述化合物的方法 (例如层析法,聚丙烯酰胺凝胶电泳,HPLC 分析,等等)测定的。

[0162] 本发明所用术语“重组子”意思是“通过遗传工程制备或是遗传工程的结果”。因此,“重组微生物”包含至少一个“重组核酸”。特别地,重组微生物包含表达载体或克隆载体,或经过遗传工程改造包含一个重组核酸序列。一种“重组蛋白”是通过在宿主表达个别的重组核酸产生的。如本发明所述,“重组启动子”是通过遗传工程获得的适合用作有功能活性的启动子的非编码核苷酸序列。

[0163] 因此,新启动子可采用独特的功能特性识别。出乎意料地,通过分析在生产工艺条件下的转录强度,确定 PAS_chr1-4 (本发明称为 CS1 基因,SEQ ID 9) 为毕赤酵母中的最强转录基因。编码的 CS1 蛋白 (SEQ ID 10) 不是糖酵解酶或蛋白,但我们通过 GPI 锚定预测其定位于细胞表面。尽管已经确定毕赤酵母的 GS115 菌株的 9.43Mbp 基因组序列,并于 US20110021378A1 中公开,但启动子的特性例如启动子序列仍未获得具体研究。

[0164] 令人惊奇的是,根据本发明,可有效使用这样的启动子。现有技术中毕赤酵母属的启动子例如用于工业规模的 POI 生产的启动子主要源自甲醇代谢途径,需要加入甲醇来诱

导 POI 生产,通常是未令人满意的。本发明的启动子和方法具有的优势是,特别是在使用化学成分确定的无甲醇碳源时,可通过增强的表达提供增加的产量,降低特定启动子调节造成的污染风险。

[0165] 结果证明,本发明的启动子将发挥主要不依赖于合适的碳源量和特定的培养基的活性。作为实施例,毕赤酵母可以在工业生产过程的条件下成功培养。首先,在基础碳源上例如甘油中实施分批培养,继而采用限制性补料补充碳源,例如葡萄糖。并在,例如使用限制型补充碳源数量的限制性生长条件下将样品输送到第 1 分批期的末端。采用 DNA 基因芯片的转录组分析显示了在补充碳源上和过量碳源例如基础碳源过量存在时具有强烈活性的特异基因。

[0166] 令人惊奇地,pCS1 启动子序列被确定为在高生长速率下和低生长速率下的强启动子。现有技术中的可比较的 pGAP 启动子明显更弱。

[0167] 在发酵工艺中可验证在基础碳源上,强的重组基因表达的特征和在限制性补充碳源上的强烈表达。

[0168] 根据本发明可作为组成型启动子序列的核苷酸序列将提供提高的重组蛋白产量,其可具有多种来源。本发明启动子的来源优选自酵母细胞,最优选自甲基营养型酵母,例如选自毕赤酵母属或选自毕赤酵母种,其启动子可作为亲本序列产生合适的变种,例如突变体或类似物。

[0169] 我们考虑到,一系列的酵母细胞,特别是毕赤酵母菌株,可适合获得不同种类的个别启动子序列或类似物。

[0170] 识别的毕赤酵母启动子的变种,包括有功能活性的变种,例如可采用标准技术获得同源物或类似物。例如,启动子可经过修饰产生具有改变的表达水平和调节特性的启动子变体。

[0171] 例如,根据本发明,通过启动子序列的突变可制备启动子库,该启动子库可作为亲本分子,例如,通过分析变种在不同发酵方案下的表达和选择合适的变种可微调真核细胞的基因表达。可使用变种合成库,例如选择产生选择性的 POI 的要求匹配的启动子。这样的启动子具有在真核宿主细胞中提高的表达效率,并在碳源丰富和限制碳源中高效表达。

[0172] 不同的发酵方案可区别生长期和生产期。生长和 / 或生产可在分批模式中、分批补料模式或连续模式中合适地发生。可使用任何合适的生物反应器,包括分批培养,分批补料培养的,连续培养的,带搅拌的罐反应器或气升式反应器。

[0173] 提供在实验室或工业规模的发酵工艺是有益的。工业方法规模优选采用的容积至少是 10L,特别是至少 50L,优选至少 1m³,优选至少 10m³,最优选至少 100m³。

[0174] 工业规模的生产条件优选为,例如,在 100L ~ 10m³或更大的反应器中采用典型的数天的加工时间分批补料培养,或在大约 50 ~ 1000L 或更大的发酵容器中同时稀释速率为 0.02 ~ 0.15h⁻¹ 的连续工艺。

[0175] 合适的培养技术包括在从分批培养期开始,继而是短的指数型高特异生长速率的分批补料期,进一步接着是低特异生长速率的分批补料期。另一合适的培养技术可包括分批培养期继而是低稀释速率的连续培养期。

[0176] 本发明的一优选实施方式包括分批培养提供生物量继而分批补料培养提供高产率的 POI 产量。

[0177] 根据本发明,优选在生物反应器中在生长条件下获得至少 1g/L 细胞干重,更优选的是至少 10g/L 细胞干重和优选至少 20g/L 的细胞干重的细胞浓度在培养宿主细胞系。在实验室或工业规模提供该生物量生产的产量是有益的。

[0178] 实现生物量积累的生长培养基,特别地,或基本生长培养基,典型地包含一种碳源,一种氮源,一种硫源和一种磷源。典型地,这样地一种培养基包含更多的微量元素和维生素,并进一步包含氨基酸,戊糖或酵母分离物。

[0179] 优选的氮源包括 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 或 NH_3 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

[0180] 优选的硫源包括 MgSO_4 , 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或 K_2SO_4 ;

[0181] 优选的磷源包括 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 或 H_3PO_4 或 NaH_2PO_4 , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 或 K_2HPO_4 ;

[0182] 进一步的典型的培养基组分包括 KCl , CaCl_2 和微量元素,比如: Fe 、 Co 、 Cu 、 Ni 、 Zn 、 Mo 、 Mn 、 I 、 B ;

[0183] 优选地,所述培养基补充了维生素 B_7 ;

[0184] 毕赤酵母的典型生长培养基包含甘油、山梨糖醇或葡萄糖, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 MgSO_4 、 KCl 、 CaCl_2 、生物素和微量元素。

[0185] 在生产期,一种生产培养基特别地与唯一的限制数量的补充碳源一起使用。

[0186] 优选地,宿主细胞系是在添加了合适碳源的培养矿物基上培养,因此,进一步地,显著地简化了分离过程。优选的矿质培养基的一个实施例是包含一种可利用的碳源(例如葡萄糖、甘油、山梨糖醇、甲醇),包含大量元素(钾、镁、钙、铵、氯、硫、磷)和微量元素(铜、锰、碘、钼、钴、锌和铁盐和硼酸),和可选择的维生素或氨基酸,例如用于补充营养缺陷型的培养基。

[0187] 所述细胞是在适合实现表达需要的 POI 的条件下培养,可根据表达系统和表达蛋白的性质,例如蛋白是否与信号肽融合以及该蛋白是否可溶或是膜结合的,从细胞或培养基中纯化该蛋白。正如本领域熟练技术人员即将理解的,培养条件将根据包括宿主细胞类型,特别是采用的载体的表达而发生变化。

[0188] 根据本发明,通过选择合适的启动子序列,可选择地与优选的调节序列结合,在比较条件下,相对于和生产细胞同源的 GAP 启动子,一种天然的或从毕赤酵母分离的 pGAP,其可提供相同的,或至少大约 1.1 倍,或至少大约 1.2 倍,至少大约 1.5 倍,至少大约 2 倍,至少大约 3 倍,至少大约 4 倍,至少大约 5 倍,至少大约 10 倍,至少高达 15 倍的活性,例如,该活性是在分批补料工艺中生长限制条件下,如采用启动子活性或转录强度表示的,或由启动子强度调节的。

[0189] 一种典型的生产培养基包含一种补充碳源,和进一步的 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, MgSO_4 , KCl , CaCl_2 , 生物素和微量元素。

[0190] 比如,添加到发酵液中的补充碳源的补料可包含一种高达百分之五十的可利用糖类。补充培养基的低补料速率将限制产物或副产物对细胞生长的抑制,因此,基于碳源供应的高生产量是可能实现的。

[0191] 发酵优选在 pH 为 3 ~ 7.5 范围内实施。

[0192] 典型的发酵时间是 24 ~ 120 小时,同时采用的温度范围为 20°C ~ 35°C , 优选 22°C ~ 30°C 。

[0193] 总而言之,可通过本领域熟练技术人员公知的重组基础产生本发明提及的重组

核酸或生物。根据本发明,现有技术中存在可采用的传统分子生物学,微生物学,和重组 DNA 技术。文献中充分解释了这种技术。参见例如,Maniatis,Fritsch&c, "Molecular Cloning(《分子克隆》):A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,(1982).(实验手册,冷泉港,1982 版)。

[0194] 根据本发明优选的实施方式,重组构建物是通过连接启动子和相关基因进入载体或表达构建物获得的。可通过采用这种载体或表达构建物转化宿主细胞将这些基因稳定整合进入所述宿主细胞。

[0195] 表达载体可包括但不限于克隆载体,修饰克隆载体和特异设计的质粒。本发明使用的优选表达载体可以是适合在宿主细胞中表达重组基因的任何表达载体,并可据宿主生物选择。所述重组表达载体可以是能够复制或整合进宿主生物基因组的任何载体,也称为宿主载体。

[0196] 合适的表达载体典型地包含适合在真核宿主细胞表达编码 POI 的 DNA 的进一步调节序列。调节序列的实施例包括操纵子,增强子,核糖体结合位点,和控制转录和翻译起始和终止的序列。所述调节序与表达序列操作性连接。

[0197] 根据本发明,为实现重组核苷酸序列在宿主细胞中的表达,所述表达载体可提供邻近编码序列 5' 端例如 GOI 的上游启动子或实现 POI 分泌的信号肽基因。因此所述转录由该启动子序列调节和启动。

[0198] 信号肽可以是异源信号肽或天然和异源信号肽的杂交,并且可特别地和产生该蛋白的宿主生物异源或同源。所述信号肽的,功能是实现 POI 分泌进入内质网。该信号肽通常是一个短的(3~60 个氨基酸长)多肽链,指导蛋白转运到质膜外,因此使分离和纯化异源蛋白变得容易。蛋白质转运后,某些信号肽被信号肽酶剪切。

[0199] 典型的信号肽是来自酿酒酵母的 α - 配对因子预处理多肽和来自毕赤酵母酸性磷酸酶基因(PHO1)的信号肽。

[0200] 如果启动子控制编码序列的转录,启动子序列可理解为与编码序列操作关联。如果启动子序列不是与编码序列天然相关,其转录不受天然(野生型)细胞启动子的控制,或该序列与不同的邻近序列重组。

[0201] 为了证明相关序列的功能,可构建包含一个或多个调节元件的表达载体来驱动 POI 的表达,并且将表达产量和带有传统调节元件的构建物比较。以下实施例详细描述了实验过程。通过 PCR 用特异核苷酸引物从毕赤酵母扩增了确定的基因,并克隆进入一个表达载体,转化进入真核细胞系,例如,用酵母载体和高水平生产各种不同 POI 的毕赤酵母菌株。为了估计本发明启动子对重组 POI 产量的影响,可将真核细胞系在摇瓶实验中分批补料培养或恒化器发酵培养,并与包含传统组成型例如,生长依赖性启动子,例如,个别细胞中的标准 pGAP 启动子的菌株进行比较。特别地,启动子选择对重组蛋白的生产有重要影响。

[0202] 可采用重组细胞系通过培养转化子生产、从而在合适的培养基中获得 POI,从培养液中分离表达的产物或代谢物,并通过合适的方法选择性纯化所述 POI。

[0203] 根据本发明,该转化子可通过引入这种载体 DNA,例如质粒 DNA 进入宿主,并选择高产量表达所述 POI 或宿主代谢物的转化子获得。可通过用于转化真核细胞的传统方法,例如电脉冲法,原生质法,醋酸锂法,及其改进方法处理宿主细胞,使之整合外源 DNA。优选

通过电穿孔转化毕赤酵母。优选的转化微生物吸收重组 DNA 片段的方法包括化学转化法,电穿孔法或通过原生质体转化法。可通过将这样的载体 DNA,例如质粒 DNA,进入宿主,并选择高产量表达相关蛋白或宿主代谢物的转化子以获得本发明的转化子。

[0204] 根据本发明,优选若干不同的 POI 生产方法。可通过采用包含编码相关蛋白的重组 DNA 和至少一种本发明所述的调节元件的表达载体转化真核宿主细胞,制备转化细胞的培养物,使培养物生长,诱导转录和 POI 生产,并回收发酵过程的产物来表达、加工和选择性分泌物质。

[0205] 根据本发明,优选通过下列实验测定宿主细胞的表达能力或产量:酶联免疫吸附试验(ELISA)、酶活性检测、高效液相色谱(HPLC)或其他合适的试验。

[0206] 优选采用生产产量至少为 1mg/L,优选至少为 10mg/L,优选至少为 100mg/L,更优选至少为 1g/L 的条件表达所述 POI。

[0207] 可以理解的是,本发明公开的方法可进一步包括在允许表达 POI 的条件下,培养所述重组宿主细胞,优选以分泌形式或其他胞内产品的形式表达 POI。然后,可通过本领域熟练技术人员公知的技术从细胞培养基分离重组生产的 POI 或宿主细胞代谢物并进一步纯化。

[0208] 根据本发明,典型地,可采用现有技术包括提高需要的 POI 的浓度和/或降低至少一种杂质的浓度分离和纯化所述产生的 POI。

[0209] 如果所述 POI 是从细胞分泌的,可采用现有技术从细胞培养中分离和纯化所述 POI。因为所述产品是从培养悬浮液中回收而不是从蛋白质复合混合物(破坏酵母细胞释放胞内蛋白时获得)中回收,从宿主细胞中分泌重组子表达产物对于促进纯化过程通常是有益的。

[0210] 也可通过超声或机械地,酶学的或化学的方法破碎培养的转化子细胞,从而获得包含需要的 POI 的细胞分离物,从中分离和纯化所述 POI。

[0211] 作为获得重组多肽或蛋白产品的分离和纯化方法,可采用的方法包括例如采用溶解度差异的方法,例如盐析和溶剂沉淀方法,采用分子量差异的方法,例如超滤和凝胶层析法,采用电荷差异的方法,例如离子交换层析法,采用特异亲和性的方法,例如亲和层析法,采用疏水性差异的方法,例如反相高效液相层析法,和采用等电点差异的方法,例如等电聚焦法。

[0212] 高度纯化的产品基本上是无污染的蛋白质,优选纯度为至少 90%,更优选至少 95%,或甚至至少为 98%,直到 100%。可通过从细胞碎片中纯化细胞培养悬浮物或其他获得纯化的产品。

[0213] 下列标准方法可优选作为分离和纯化方法:细胞破碎(如果所述 POI 是从胞内获得),通过微滤或切向流过滤(TFF)或离心分离和洗涤细胞(碎片),通过沉淀或热处理来纯化 POI,通过酶解激活 POI,通过层析例如离子交换(IEX),疏水作用色谱(HIC),亲和层析,分子筛(SEC),或高效液相色谱层析(HPLC)纯化 POI,通过超滤步骤来浓缩和洗涤 POI 沉淀。

[0214] 可通过传统方法例如免疫印迹法、HPLC、酶活力测定法或 ELISA 分离和纯化所述 POI。

[0215] 所述 POI 可以是任何真核、原核或合成多肽。它可以是分泌蛋白或胞内蛋白。本

发明还提供了天然存在蛋白的功能同源物,功能等同变种、衍生物和生物学活性片段的重组产物。优选地,功能同源物优选和某序列一致的或与其对应,并具有其功能上的特征。

[0216] 本发明中,POI 可以示与真核宿主细胞同源的或异源的的产品,优选用于治疗、预防、诊断、分析或工业用途。

[0217] 优选地,所述 POI 是一种异源重组多肽或蛋白,在真核细胞中产生,优选在酵母细胞,优选为分泌蛋白。优选的产生蛋白的实施例是免疫球蛋白,免疫球蛋白片段,抑肽酶、组织因子途径抑制剂或其他蛋白酶抑制剂,和胰岛素或胰岛素前体,胰岛素类似物、生长激素、白细胞介素、组织纤溶酶原激活物,转化生长因子 a 或 b,胰高糖素,胰高血糖素样肽 -1 (GLP-1) 胰高血糖素样肽 -2 (GLP-2)、GRPP、第 V II 因子、第 V III 因子、第 X III 因子、血小板源生长因子 1、血清白蛋白、酶,例如脂酶或蛋白酶等,或功能相同,功能等价的变种,与天然蛋白质具有类似功能的生物活性片段。所述 POI 可以是与天然蛋白结构上相似,并且通过添加一个或多个氨基酸到天然蛋白的 C 端和 N 端或侧链,在天然氨基酸序列的一个或多个位点替换一个或多个氨基,在天然蛋白的一端或两端或氨基酸序列的一个或多个位点删除一个或多个氨基酸,或在天然氨基酸序列的一个或多个位点插入一个或多个氨基酸,从而源自天然蛋白。这样的修饰对上述的若干蛋白质是众所周知的。

[0218] 一种 POI 也可选自在宿主细胞中提供生物学反应底物、酶、抑制剂或辅因子,目的是获得所述生物化学反应或多个反应的级联的产物,例如获得宿主细胞的代谢物。根据本发明,范例产品可以是维生素,例如核黄素,有机酸和醇类,可在重组蛋白或 POI 的表达后获得提高的产量。

[0219] 总而言之,表达重组产物的宿主细胞,可以是任何适合表达 POI 的真核细胞。

[0220] 优选的哺乳动物细胞的实施例是幼仓鼠肾细胞 (BHK), CHO (CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHO-K1, CHOK1SV, CHO-S), HeLa, 人胚肾 (HEK293), 狗肾传代细胞 (MDCK), NIH3T3, NS0, PER. C6, SP2/0 和 VERO 细胞。

[0221] 根据本发明,用于作为宿主细胞的优选的酵母细胞的实施例包括但不限于酵母属 (例如毕赤酵母或甲醇毕赤酵母), 毕赤酵母属 (毕赤酵母 (*K. pastoris*)、毕赤酵母 (*K. pseudopastoris*) 或毕赤酵母 (*K. phaffii*)), 多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*) 或克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)。

[0222] 更新的文献将毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 分类和重命名为毕赤酵母 (*Komagataella pastoris*)、毕赤酵母 (*Komagataella phaffii*) 和毕赤酵母 (*Komagataella pseudopastoris*)。本发明的毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 用于作为全部毕赤酵母 (*Komagataella pastoris*)、毕赤酵母 (*Komagataella phaffii*) 和毕赤酵母 (*Komagataella pseudopastoris*) 的同义。

[0223] 优选的酵母细胞源自甲醇营养型酵母,比如来自毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 或毕赤酵母 (*Komagataella pastoris*), 例如毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 或毕赤酵母 (*K. pastoris*) 或毕赤酵母 (*K. phaffii*) 或毕赤酵母 (*K. pseudopastoris*) 宿主的实施例包括酵母例如毕赤酵母。毕赤酵母菌株的实施例包括 CBS 704 (= NRRL Y-1603 = DSMZ 70382), CBS 2612 (= NRRL Y-7556), CBS 7435 (= NRRL Y-11430), CBS 9173-9189 (CBS 菌株: CBS-KNAW 真菌生物多样性中心 (Centraal bureau voor Schimmel-cultures, Utrecht, The Netherlands), 和 DSMZ 70877 (German Collection

of Micro-organisms and Cell Cultures), 也包括源自 Invitrogen 的菌株, 如 X-33, GS115, KM71 和 SMD1168。酿酒酵母菌株的实施例包括 W303, CEN.PK 和 BY- 系列 (EUROSCARF 采集) 上述所有菌株已经成功用于产生转化子和表达异源基因。

[0224] 根据本发明, 首选的酵母宿主细胞, 例如毕赤酵母或酿酒酵母宿主细胞, 包含异源或重组启动子序列, 该序列源自不同于生产宿主的 *P. pastoris* 或酿酒酵母菌株。根据本发明, 在其他特别实施方式中, 宿主细胞包含重组构建物, 该构建物包含源自和宿主细胞同属、种或菌株的启动子。

[0225] 本发明的启动子优选源自编码与宿主细胞同源的蛋白的基因。

[0226] 例如, 本发明的一种启动子可源自酵母, 例如酿酒酵母菌株和用于表达 POI。根据本发明, 一个特别优选的实施方式涉及源自用于在毕赤酵母生产宿主细胞系中生产重组 POI 的方法的毕赤酵母的启动子。所述核苷酸序列的同源起源有助于其整合到同属或同种的宿主细胞, 因此, 实现了稳定生产 POI 同时可能提高工业生产过程中的产量。也可使用源自其他合适的酵母或其他真菌或源自其他生物例如脊椎动物或植物的启动子的有功能活性的变种。

[0227] 如果所述 POI 是宿主细胞的一种同源蛋白, 即一种天然存在于宿主细胞的蛋白, 所述 POI 在所述宿主细胞中的表达可通过其天然启动子序列与本发明启动子序列的交换进行调节。

[0228] 例如, 通过用包含靶基因的同源序列的重组 DNA 分子转化宿主细胞来允许位点特异性重组, 从而实现该目标, 该启动子序列和选择性标记适合宿主细胞。为了将启动子序列与编码 POI 的核苷酸序列可操作的连接, 可进行位点特异性重组。以上引起从本发明的启动子序列而不是从天然启动子序列表达 POI。

[0229] 在本发明的特别优选的实施方式中, 启动子序列相对于天然 POI 启动子序列具有提高的启动子活性。

[0230] 根据本发明, 优选提供一种包含本发明启动子序列的毕赤酵母宿主细胞, 该启动子序列与编码 POI 的核苷酸序列操作性连接。

[0231] 本发明, 还可能提供一种根据本发明的通配载体或宿主细胞, 它包含根据本发明的启动子, 并且, 可即时整合编码 POI 的感兴趣的基因。因此, 该通配细胞系, 是一种形成的宿主细胞系, 其特征是其表达能力。这遵循了一种产生用于 POI 生产的细胞系的创新的“通配的”平台方案, 例如用位点特异性的重组酶调节盒交换法 (site-specific recombinase-mediated cassette exchange)。这样的新宿主细胞有利于在数天内将感兴趣的基因 (GOI) 克隆进入预先确定的基因组表达热点以便获得可复制的、高效生产的细胞系。

[0232] 根据优选实施方式, 本发明的方法采用了编码 POI 的重组核苷酸序列, 该序列是提供在适合以每个细胞单拷贝或多拷贝整合进宿主细胞系的质粒上。所述编码 POI 的重组核苷酸序列也可以每个细胞单拷贝或多拷贝提供于自主复制的质粒上。

[0233] 本发明的优选的方法采用一种质粒, 它是一种真核表达载体, 优选一种酵母表达载体。表达载体可包含但不限于克隆载体, 经修饰的克隆载体和特别设计的质粒。本发明所用的优选的表达载体可以是任何适合于在宿主细胞表达重组基因的表达载体, 并且可根据宿主生物选择。所述重组表达载体可以是能够在宿主生物基因组中复制或整合到其中的

任何载体,也称为宿主载体,例如酵母载体,其携带根据本发明的 DNA 构建物。一种优选的酵母表达载体是用于在选自自由汉逊酵母属、毕赤酵母属、假丝酵母属和球拟酵母属组成的组的酵母中表达。

[0234] 在本发明中,优选使用源自 pPICZ、pGAPZ、pPIC9、pPICZalpha、pGAPZalpha、pPIC9K、pGAPHis 或 pPUZZLE 的质粒为载体。

[0235] 根据本发明的一优选实施方式,一种重组构建物是通过连接相关基因进入载体获得的。这些基因可通过采用这种载体转化宿主细胞稳定整合进入所述宿主细胞。可采用重组宿主细胞系通过培养转化子,在合适的培养基上获得,从培养中分离表达的 POI,然后通过适于表达产物的方法纯化,特别是从污染蛋白中分离 POI,以生产这些基因编码的多肽。

[0236] 表达载体可包含一个或多个可选择的表现型标记,例如,一种编码提供抗生素抗性 or 提供自养需求的蛋白的基因。酵母载体通常包含一个来自酵母染色体的复制起点,一个自主复制序列 (ARS),或可选择地,一个用于整合进入宿主基因组的序列,一个启动子区,用于聚腺苷酸化的序列,用于转录终止的序列,和选择性标记。

[0237] 用于连接 DNA 序列例如,编码前体序列和 / 或 POI,启动子和终止子,然后将它们插入包含整合或宿主复制必须的信息的合适载体的程序,是本领域熟练技术人员公知的,例如, Sambrook 等人所述 (A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989)。

[0238] 可以理解的是,使用根据本发明的调节元件和 / 或 POI 作为整合靶标的载体,其构建方法既可以是制备一种包含编码调节元件和 / 或 POI 的整个 DNA 序列的 DNA 构建物,随后将该片段插入一种合适的表达载体,也可以是通过连续插入包含适于单个元件的遗传信息的 DNA 片段,随后连接。

[0239] 根据本发明可使用多克隆载体,它具有多克隆位点,其中,需要的异源基因可结合在多克隆位点以便提供一种表达载体。在表达载体,启动子是位于 POI 基因的上游,并调节该基因的表达。就多克隆载体的情况来说,因为所述 POI 基因是在多克隆位点引入,该启动子是位于多克隆位点的上游。

[0240] 本发明用于获得重组宿主细胞的 DNA 构建物可通过建立的标准方法,例如磷酸胺酸法合成制备。所述 DNA 构建物也可以是基因组或 cDNA 起源,例如,通过制备一种基因组或 cDNA 库和通过使用符合标准技术的合成的寡核苷酸探针并通过杂交筛选编码全部或部分本发明多肽的 DNA 序列获得 (Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989)。A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1989)。按照标准技术,最后,所述 DNA 构建物可以是合成的和基因组来源的混合,合成的和 cDNA 来源的混合或基因组和 cDNA 来源的混合,其是通过将合成的、基因组或 cDNA 来源的片段进行退火而制备,如适用,该片段和整个基因组构建物的各个部分对应。

[0241] 在另一优选实施方式中,例如所述酵母的表达载体能够通过同源重组稳定整合到宿主基因组。

[0242] 根据本发明通过采用调节元件和 / 或 POI 基因转化宿主细胞获得的本发明的转化株宿主细胞可优选地首先在可有效生长到大量细胞的条件下培养。当所述细胞系是制备用于表达 POI 时,选择培养技术用于产生表达产品。

[0243] 特别的实施例涉及分批补料发酵重组的生产产生报告蛋白的毕赤酵母细胞系,其采用甘油分批培养基和葡萄糖分批补料培养基。比较性启动子活性研究已经证明,本发明

的启动子可以成功用于重组蛋白生产。

[0244] 根据进一步的实施例,人血清白蛋白(HSA)是作为一种POI在葡萄糖限制条件下生产,并且,HSA产量和基因拷贝数确定

[0245] 根据另一实施例,在本发明的启动子控制条件下分批补料培养了表达HSA的毕赤酵母菌株。

[0246] 进一步的实施例涉及在pCS1启动子的转录控制下表达作为模式蛋白的猪的羧肽酶B。

[0247] 再者,一个进一步的实施例涉及在pCS1的转录控制下表达一种抗体片段。

[0248] 一个进一步的实施例涉及根据本发明启动子的大小或长度变种,例如延长的pCS1序列pCS1a(SEQ ID 2),它包含pCS1序列和在5'端的延长,或长度在80bp~800bp范围内的pCS1片段。

[0249] 参考下列实施例可完全理解前述说明。但是,这些实施例仅仅是代表本发明的一种或多种实施方式,并非限制本发明的范围。

[0250] 实施例

[0251] 下述实施例说明了用于确定新启动子和分析其在毕赤酵母中的表达特性的材料和方法。

[0252] 实施例1:识别毕赤酵母中的强表达启动子

[0253] 为了识别毕赤酵母中的强基因和具体启动子,采用DNA芯片分析了其基因表达谱。分析了毕赤酵母(*P. pastoris*)细胞在甘油分批和在葡萄糖限制(恒化器)中的生长。

[0254] a) 菌株

[0255] 采用了能够在不添加补充物的基本培养基上生长的野生型毕赤酵母菌株(CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)

[0256] b) 毕赤酵母培养

[0257] 用实验室小型发酵罐(Infors-HT, Switzerland)实施了发酵,最终有效容积是2.5L。

[0258] 使用下列培养基:

[0259] 每升PTM1微量盐母液,包含:

[0260] 6.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08g NaI, 3.36g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02g H_3BO_3 , 0.82g CoCl_2 , 20.0g ZnCl_2 , 65.0g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g 生物素和 5.0ml H_2SO_4 (95% -98%)

[0261] 每升甘油分批培养基包含:2g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 39.2g 甘油, 20.8g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.6g KCl, 0.022g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.8mg 生物素和 4.6ml PTM1 微量元素盐母液。添加HCl,将pH调为5。

[0262] 每升甘油分批培养基包含:

[0263] 632g 甘油, 8g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 22g KCl, 和 0.058g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

[0264] 每升恒化器培养基包含:

[0265] 2g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 99.42g 一水葡萄糖, 22g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 1.3g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.4g KCl, 0.02g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4mg 生物素和 3.2ml PTM1 微量元素盐母液。添加HCl,将pH调为5。

[0266] 采用搅拌速度 (500 ~ 1250rpm) 将溶解氧控制在 $DO = 20\%$ 。通气速率是 60L/h 空气, 温度控制在 25°C , 添加 $\text{NH}_4\text{OH}(25\%)$ 将 pH 控制在 5。

[0267] 将 1.5L 分批培养基灭菌过滤进入发酵罐, 从在 YPG, 180rpm, 28°C 过夜预培养接种起始 1L 光密度 (OD_{600}) = 1 的毕赤酵母启动发酵。大约经过 25h 的分批培养期, 到达大约 20g/L 的干物质质量浓度, 接着进行 10h 的葡萄糖培养基指数分批补料培养, 产生大约 50g/L 的干物质质量浓度。然后, 培养体积降到 1.5L, 并从 0.15L/h 的补料 / 收获比开始恒化器培养, 产生 $\mu = 0.1$ 的恒定生长率。恒化器培养开始 50h 后发酵终止。

[0268] 本次发酵实施三次, 以获得进行可重复的芯片分析必须的生物学样品。

[0269] 可通过培养悬浮液的 HPLC 分析验证恒化器期间的碳源限制性条件 (不是可测定的残余葡萄糖)。

[0270] c) 取样

[0271] 在甘油分批期的末期并在葡糖恒化器稳定状态条件下取样。每次发酵在发酵罐边进行常规取样以确定 OD 或酵母干物质质量, 定性显微镜检和细胞活力分析。按照如下方法取样和处理以进行芯片分析: 为了进行光猝灭, 直接将 9ml 细胞培养液与 4.5ml 冰冷的 5% 石炭酸 (Sigma) 溶液 (乙醇溶解, 绝对值) 混合, 并分装成多个小份。将 2mL 每份在预冷的收集管 (GE 医疗保健, NJ) 中离心 (13200rpm 离心 1min), 完全移除悬浮液, 将收集管在 -80°C 储存, 直到进行 RNA 纯化。

[0272] d) RNA 纯化和芯片杂交的样品制备

[0273] 按照供应商 (Ambion, US) 说明书, 采用 TRI 试剂分离 RNA。将细胞小球重悬于 TRI 试剂, 并且用玻璃珠 FastPrep 24 (MP. Biomedicals, CA) 在 5m s^{-1} 处理 40 秒将细胞小球进行均质。添加氯仿后, 将样品离心, 通过添加异丙醇从水相沉淀总 RNA。用 70% 乙醇洗涤细胞小球, 干燥, 重悬于无 RNA 酶的水中。通过用 Nanodrop 1000 分光光度计 (NanoDrop 产品, DE) 测定 OD_{260} 确定 RNA 浓度。用无 DNA 试剂盒 (Ambion, CA) 移除样品中的残余 DNA。在无 RNA 酶的水中将相当于 10gRNA 的样品量稀释到 $50\mu\text{L}$, 然后添加 DNA 酶缓冲液 I 和 rDNA 酶 I, 在 37°C 孵育 30 分钟。在添加 DNA 酶失活剂后, 将样品离心, 将悬浮物转移到新管。再次如上所述确定 RNA 浓度。此外, 用 RNA 纳米芯片 (Agilent) 分析 RNA 完整性。为了监控来自样品的扩增和杂交标记流程, 可用 Spike In Kit (Agilent, Product Nr.: 5188-5279) 为阳性对照。该对照包含来自腺病毒的 10 个不同的多聚腺苷酸化的转录本, 可与自身的 RNA 样品一同扩增、标记和共杂交。采用 Quick Amp Labelling Kit (Agilent, Prod. Nr.: 5190-0444) 将样品用 Cy 3 和 Cy 5 标记。因此, 在 $8.3\mu\text{L}$ 无 RNA 酶水中稀释 500ng 纯化的样品 RNA, 添加 $2\mu\text{L}$ Spike A 或 B, 和 $1.2\mu\text{L}$ T7 启动子引物。将混合物在 65°C 变性 10 分钟, 并在冰上保持 5 分钟。然后, 添加 $8.5\mu\text{L}$ cDNA 系列 (每份样品添加: $4\mu\text{L}$ 5x 第一链缓冲液, $2\mu\text{L}$ 0.1M 二硫苏糖醇 (DTT), $1\mu\text{L}$ 10mM dNTP 混合物, $1\mu\text{L}$ MMLV-RT, $0.5\mu\text{L}$ RNase out), 于 40°C 孵育 2 小时, 然后转移到 65°C 保持 15 分钟并置于冰上 5 分钟。制备转录系列 (每份样品加入: $15.3\mu\text{L}$ 无核酸酶水, $20\mu\text{L}$ 转录缓冲液, $6\mu\text{L}$ 0.1M DTT, $6.4\mu\text{L}$ 50% 聚乙二醇 (PEG), $0.5\mu\text{L}$ RNA 酶抑制剂, $0.6\mu\text{L}$ 无机磷: 磷酸酶, $0.8\mu\text{L}$ T7RNA 聚合酶, $2.4\mu\text{L}$ 花青素 3 或花青素 5), 并将其添加到每个管中, 在 40°C 孵育 2 小时。为了纯化获得的标记 cDNA, 采用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74104)。将样品储存在 -80°C 。

[0274] 在 Nanodrop 分光光度计中进行 cRNA 浓度和标记效率的定量。

[0275] e) 微阵列芯片分析

[0276] 基因表达杂交试剂盒 (Agilent, Cat. No. 5188-5242) 用于标记样品 cRNA 的杂交。为了制备杂交样品,用无核酸酶的水将每份 300ng cRNA (Cy3 和 Cy 5) 和 6 μ L10 倍封闭剂稀释为最终 24 μ L 的体积。添加 1 μ L 25 倍片段化缓冲液后,将混合物在 60 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。然后,添加 25 μ L GEx 杂交缓冲液 HI-RPM 终止反应。在 13, 200rpm 离心后,将样品在冰上冷却,并立即用于杂交。使用内部设计的特异于毕赤酵母的寡核苷酸芯片 (AMAD-ID:026594, 8x15K custom arrays, Agilent)。根据基因芯片杂交室用户指南 (Microarray Hybridisation Chamber User Guide) (Agilent G2534A) 实施了基因芯片杂交。首先,打开垫玻片,将样品管置于样品室基座上, Agilent 标记面向上。将样品 (每个芯片 40 μ L) 加载到八个正方形的每一个的中间。然后,小心的将基因芯片玻片置于垫玻片 (Agilent 标记面向下),并盖好样品室盖,固定在管夹上。在杂交炉中在 65 $^{\circ}$ C 下杂交 17 小时。扫描前,洗涤基因芯片。因此,拆除样品室,沉入洗涤缓冲液 1 时,三层玻片互相脱离。将基因芯片直接转移到另一个装盛洗涤缓冲液 1 的盘中,洗涤 1 分钟,转移到缓冲液 2 (温度至少 30 $^{\circ}$ C),并再洗涤 1 分钟。通过将玻片边缘与组织接触将基因芯片玻片干燥后,置于玻片支架中 (Agilent 标签向上),将玻片支架置于传送带上,开始扫描。

[0277] f) 基因芯片数据的数据采集和统计评价

[0278] 将采用 G2565AA 基因芯片扫描仪 (Agilent) 在 50nm 分辨率扫描获得的图像输入 Agilent 特征提取 9.5 软件。Agilent 特征提取 9.5 用于点强度定量。将原始平均点强度数据输入开源软件 R 进行进一步标准化和数据分析。

[0279] 采用 limma 包, vsn 及 m 阵列进行数据预处理和标准化。强度数据并不是背景纠正的,并且采用 VSN 进行标准化。

[0280] 为进入高信号强度,浏览两种状态下的基因芯片数据,以便识别强表达的组成型基因。表 1 显示具有两种状态下的信号强度的最强转录基因。添加了 pGAP 和 pTEF 的数据作为参照。平均地,在两种条件下 (甘油分批培养和葡萄糖限制性恒化器培养), pCS1 超过 pGAP 约 30%,而 pTEF 比 pGAP 弱约 12%。

[0281]

启动子	基因标识	强度 ¹	pGA 强度/ 转录强度 (%)	强度 ²	pGA 强度/ 转录强度 (%)
pGAP	PAS_chr2- 1_0437	56235.2	100.0	44411.4	100.0
pTEF	PAS_FragB_0052	47046.3	83.4	39956.2	89.9
pCS1	PAS_chr1- 4_0586	83570.4	148.6	54723.2	122.7

[0282] 表 1:基因芯片数据,选择其启动子用于进一步表征, pGAP 和 pTEF 数据作为对照

[0283] ¹在甘油分批培养期 (两个通道的平均)

[0284] ²在葡萄糖限制的恒化器 (两个通道的平均)

[0285] 实施例 2:用绿色荧光蛋白 (eGFP) 作为胞内表达的报告基因,对新识别的毕赤酵母启动子 pCS1 进行比较启动子活性研究

[0286] 为了分析新识别的启动子的特性,实施如下摇瓶筛选:用含甘油作为碳源的丰富

培养基预培养 24 小时——模拟整个过程的分批培养期,继而用基础培养基和葡萄糖补料珠进行主培养——模拟整个过程的葡糖限制的分批补料期。用绿色荧光蛋白 ((eGFP) 作为启动子活性的胞内报告基因。

[0287] a) 菌株 & 表达载体

[0288] 毕赤酵母野生型菌株 (CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) 用于作为宿主菌株。用内部设计的命名为 pPUZZLE (Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010; 150(4):519-29) 的载体转化菌株,该载体包含一个大肠杆菌 (pUC19) 复制起点,一个用于在大肠杆菌和酵母菌中进行选择的抗生素抗性盒 (提供博来霉素抗性的 Sh ble 基因),一个用于感兴趣的基因 (GOI)、由多克隆位点和酿酒酵母 CYC1 转录终止子组成的表达盒,和整合进毕赤酵母基因组的基因座 (3 AOX1 区)。

[0289] b) 将新确定的启动子 pCS1 扩增和克隆进包含 eGFP 作为 GOI 的 pPUZZLE 表达载体。

[0290] pCS1 启动子 (SEQ ID) 包含 CS1 基因的 985bp 的 5' 非编码区 (参见实施例 1) 上行到起始密码 ATG, 并通过 PCR (杂合聚合酶, 新英格兰生物实验室) 用表 2 所示引物从毕赤酵母基因组 DNA 扩增。将该序列克隆进入 pPUZZLE 表达载体 pPM1aZ10_eGFP, 用 ApaI 和 SbfI 酶切割, 产生 pPM1aZ10_pCS1_eGFP。此外, 将包含通常使用的 3-磷酸甘油醛脱氢酶启动子 (毕赤酵母的 pGAP, 本发明称为 SEQ ID 13) 的载体 pPM1 aZ10_pGAP_eGFP 作为参照。用 ApaI 和 SbfI 限制内切酶位点 (参见表 2 和 3) 将该启动子插入到 eGFP 基因的起始密码子的上游。通过 Sanger 测序验证该启动子序列的正确性。

[0291]

名称	靶标	序列	T _m	限制性位点
pCS1-正向	pCS1	SEQ ID 14 GATAGGGCCCCAGGGCATCATTGAGGTTTCCAC	69.3	ApaI
pCS1-反向	pCS1	SEQ ID 15 GATACCTGAGGTTTTGTTGTTGAGTGAAGCGAGTG	69.3	SbfI

[0292] 表 2:用于启动子的 PCR 扩增的引物

[0293]

			克隆酶		
启动子	5' 引物	3' 引物	5'	3'	长度
pCS1	pCS1- 正向	pCS1- 反向	ApaI	SbfI	985

[0294] 表 3:扩增引物, 克隆酶和克隆启动子的长度

[0295] c) 在毕赤酵母表达 eGFP 用于分析启动子活性

[0296] 通过 3' AOX 基因组整合区内的 AscI 将全部质粒线性化, 然后电穿孔法 (2kV, 4ms, GenePulser, BioRad) 打入感受态的毕赤酵母。

[0297] 在包含 25 μg/mL 博来霉素 (Invivogen, CA) 的酵母浸出粉胨葡萄糖 (YPD) 平板

上选择阳性转化子（每升含：10g 酵母提取物，20g 蛋白胨，20g 葡萄糖，20g 琼脂）。菌落 PCR 用于保证转化质粒的存在。因此，通过冷却和冰冻毕赤酵母克隆 5 分钟获得基因组 DNA，直接与合适的引物用于 PCR。为了进行表达筛选，将单菌落接种到液体 YPG-Zeo 液体培养基预培养，（每升 YPG-Zeo 液体培养基含：20g 蛋白胨，10g 酵母提取物，12.6g 甘油和 25mg 博来霉素）。大约 24 小时后，预培养物用于接种 OD600 为 0.1 的主培养物到 2mL 合成筛选培养基中（每升含：22g 一水葡萄糖，22g 柠檬酸，3.15g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ，0.027g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.9g KCl，0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，2ml 500x 生物素和 1.47ml 微量盐母液 [每升含：6g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ，0.08g NaI，3g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，0.2g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.02g H_3BO_3 ，0.5g CoCl_2 ，20g ZnCl_2 ，5g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 5ml H_2SO_4]；用 5M KOH 将 pH 调到 5；过滤灭菌）和四份葡萄糖补料珠中的两份 (2glucose feed bead quarters) (24 小时后加入第二补料珠；Kuhner, CH)。由于这些补料珠具有如下方程式所述的慢的葡萄糖释放动力学，可获得葡萄糖限制的生长条件：(葡萄糖) = $1.63 \cdot t^{0.74} [\text{mg}/\text{培养皿}]$ 。在每次预培养结束时取样，接种主培养物后 24 小时和 48 小时分别取样。通过测定 OD600 确定细胞密度，通过在 Stadlmayr 等人 (J. Biotechnology 2010 Dec ;150(4):519-29) 所述的流式细胞仪分析 eGFP 的表达。(J. Biotechnology 2010Dec ;150(4):519-29)。每个样品分析 10000 个细胞。用未转化的毕赤酵母野生型细胞测定毕赤酵母的自动荧光，从中减去信号。相关 eGFP 表达水平（与细胞大小相关的荧光强度）显示为在组成型 pGAP 控制下表达 eGFP 的克隆的 eGFP 表达水平的百分比。

[0298] 结果显示于表 4。在预培养（分批）末期，在 pCS1 启动子控制下的克隆表达超过了 pGAP 38%，在主培养（分批补料）末期，具有 4 倍的 GFP 表达水平。

[0299]

	预培养		主培养	
	分批培养末期	stdev	48 小时	stdev
pCS1	138.2	26.6	400.7	
pGAP	100.0		100.0	

[0300]

[0301] 表 4：在新的 pCS1 启动子控制下表达 eGFP 的毕赤酵母克隆的每个细胞大小的平均 GFP 荧光。数据显示在同时间点与 pGAP 相关。

[0302] d) 实施例 2C 确定毕赤酵母克隆的 eGFP 基因的拷贝数 (GCN)

[0303] GCN 代表整合到毕赤酵母基因组内的报告蛋白表达盒的数量。如下列进一步的实施例 5 所述，在 pCS1 或 pGAP 控制下表达 eGFP 的克隆的 GCN 决定。eGFP 的表达水平分析如实施例 2c。作为实例，表 5 显示了每个启动子的一个克隆的结果。在筛选培养中，与在具有相同 GCN 的 pGAP 启动子控制下表达的克隆比较，在新的 pCS1 启动子控制下表达 eGFP 的克隆产生两倍数量的 eGFP。

[0304]

克隆	FL/细胞大小	GCN	荧光值/细胞大小 /GCN
pGAP-eGFP#2	6.0	1	6.0
pCS1-eGFP#4	13.0	1	13.0

[0305] 表 5:在与 GCN 相关的 pGAP 或 pCS1 控制下的筛选培养中的 eGFP 表达。每个 GCN, pCS1 克隆表达的 eGFP 量是 pGAP 克隆的两倍。

[0306] e) 在分批补料发酵中分析 pCS1 启动子强度

[0307] 为了评估在生产过程类似的条件下 pCS1 启动子活性,分批补料培养了 1 个 pCS1 克隆 (pCS1_eGFP#4) 和一个 pGAP 克隆 (pGAP_eGFP#2),每个都含一个拷贝的 eGFP 表达盒 (参见实施例 2d)。

[0308] 在 DASGIP 反应器中进行终体积为 1.0L 的分批补料发酵。

[0309] 采用下列培养基:

[0310] PTM1 微量元素盐母液,每升含:

[0311] 6.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08gNaI, 3.36g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02g H_3BO_3 , 0.82g CoCl_2 , 20.0g ZnCl_2 , 65.0g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g 生物素和 5.0ml H_2SO_4 (95% -98%)。

[0312] 甘油分批培养基每升含:

[0313] 2g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 39.2g 甘油, 12.6g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9g KCl, 0.022g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4mg 生物素和 4.6ml PTM1 微量元素盐母液。添加 HCl 调 pH 到 5。

[0314] 葡萄糖分批补料培养基,每升含:

[0315] 464g 一水葡萄糖, 5.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8.4g KCl, 0.28g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.34mg 生物素和 10.1mL PTM1 微量元素盐母液。

[0316] 采用搅拌速度 (400-1200rpm) 将溶氧控制在 $\text{DO} = 20\%$ 。通气速率为 24L/h 空气, 温度控制在 25°C , 而添加 NH_4OH (25%) 将 pH 调到 5。

[0317] 为了启动发酵,将 400ml 分批培养基灭菌,过滤到发酵罐,(从预培养物)接种毕赤酵母克隆 pCS1_eGFP#1,起始 OD 为 1 (OD600)。大约 25 小时分批期 (到达大约 20g/L 的干物质浓度),继而是葡萄糖限制的分批补料发酵培养 (从指数补料 7 小时开始,恒定补料速率 15g/L 达 13 小时,产生最终大约 110g/L 的干物质浓度)。在分批培养和分批补料培养期取样,并采用读板器分析 eGFP 表达 (Infinite 200, Tecan, CH)。因此,将样品稀释到 $\text{OD}_{600} = 5$ 。一式两份进行发酵。结果以每个生物反应器的相对荧光值 (FL/r) 显示在表 6。与整个发酵过程的 pGAP 比较,在 pCS1 启动子控制下的克隆表达平均具有 42 倍的 eGFP 表达。

[0318]

	pGAP- eGFP#2		pCS1- eGFP#1		比较
时间 (小时)	FL/r	STDEV	FL/r	STDEV	pGAP/pCS1
-4.5	2.1	0.1	9.3	0.6	4.4
0.8	4.7	0.1	16.8	0.9	3.6
2.3	5.9	1.0	20.2	1.5	3.4
4.3	9.2	0.1	35.3	1.4	3.8
6.8	14.2	0.6	57.6	4.0	4.1
17.9	57.6	4.2	288.2	15.6	5.0
19.9	86.0	16.6	337.3	26.5	3.9
21.6	73.9	9.7	379.9	41.7	5.1

[0319] 表 6 :两个不同的在优化的分批补料培养中表达 eGFP 的毕赤酵母克隆的每个生物反应器的相对荧光, t 表示补料时间。

[0320] f) 在不同生长条件和底物中的 pCS1 的启动子活性。

[0321] 为了获得关于在不同的培养条件和生长条件下 pCS1 的启动子活性的更多信息, 将菌株 pCS1_eGFP#4 在含不同碳源, 具有不同的 PH 值的 YP 培养基和在合成基础培养基上培养。接种主培养物后 24 小时和 48 小时后取样, 通过实施例 2c 所述的流式细胞仪分析。

[0322] 如参考, 将 pCS1-eGFP#4 或 pGAP-eGFP#2 单菌落接种在液体 YPG-Zeo 培养基 (每升含 :20g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, 12.6g 甘油和 25mg 博来霉素) 作为预培养基。预培养大约 24 小时后, 预培养物用于将 OD600 为 0.1 的主培养物接种到 2mL 主培养基。主培养基组成如下 :每升 YP 培养基含 :20g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, pH 7.0-7.5 ;YPD:YP+2% 葡萄糖。YPG:YP+2% 甘油, YPM:YP+1% 甲醇, YPE:YP+1% 乙醇, YP 补料珠 :YP+1 葡萄糖补料珠 (Kuhner, CH, 直径 6mm) ;YPD pH4.5 :用 HCl 将 YPD 调 pH 为 4.5 ;SCD :合成的筛选培养基 (每升含 :22g 一水葡萄糖, 22g 柠檬酸, 3.15g (NH₄)₂HPO₄, 0.027g CaCl₂ · 2H₂O, 0.9g KCl, 0.5g MgSO₄ · 7H₂O, 2mL 500X 生物素和 1.47mL 微量元素盐母液 [每升含 :6g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08gNaI, 3g MnSO₄ · H₂O, 0.2g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.02g H₃BO₃, 0.5g CoCl₂, 20g ZnCl₂, 5g FeSO₄ · 7H₂O 和 5mL H₂SO₄] ;用 5M KOH 调 pH 为 5 ;过滤灭菌)。除了采用补料珠的培养, 在 19 小时和 43 小时后, 其他全部培养都采用 5% 的各自碳源培养。每个细胞大小的 eGFP 荧光的结果显示在表 7。

[0323] 24 小时和 48 小时后, 在 YPD 上, pCS1 表达水平超过 pGAP 的表达水平 2 倍, 而 24 小时和 24 小时后, 在 YPG 上 pCS1 的表达水平是 pGAP 的 3.9 倍。采用甲醇或乙醇作为碳源时, 或在 pH 4.5 (表 7) 在新 pCS1 启动子的控制下的表达水平甚至更高。

[0324]

克隆	主培养的培养基	24 小时	48 小时
pGAP-eGFP#2	YPD	291.0	392.9
pGAP-eGFP#2	YPG	194.8	393.0
pGAP-eGFP#4	YPD	598.7 ± 6.4	890.2 ± 52.2

pGAP-eGFP#4	YPG	770.8±17.5	1521.4±77.2
pGAP-eGFP#4	YP+ 葡萄糖补料珠	724.3±4.6	1559.3±28.3
pGAP-eGFP#4	YPM	844.0±25.4	1526.4±65.3
pGAP-eGFP#4	YPE	873.1±16.0	1658.0±344.4
pGAP-eGFP#4	YPD, pH 4.5	742.1±62.8	1938.8±62.9
pGAP-eGFP#4	SCD, pH 5.0	382.4±11.5	1072.2±167.1

[0325] 表 7: 在不同的筛选培养基上培养 24 小时和 48 小时后, 毕赤酵母克隆 pGAP_eGFP#2 或 pCS1-eGFP#4 每个细胞大小的相应 eGFP 荧光值。这里给出了 2 个培养的平均值和 SD。

[0326] 实施例 3 : 用人血清白蛋白 (HSA) 作为胞外表达的报告基因, 对新识别的毕赤酵母启动子 pCS1 进行比较启动子活性研究

[0327] 为了分析新识别的表达分泌的报告蛋白的启动子的特性, 实施如下摇瓶筛选 : 用含甘油作为碳源的丰富培养基预培养 24 小时——模拟整个过程的分批期, 继而用缓冲的丰富培养基 (2% 的葡萄糖) 进行主培养。用每隔 12 小时 0.5% 的葡萄糖主培养补料进行主培养 :

[0328] a) 菌株 & 表达载体

[0329] 毕赤酵母野生型菌株 (CBS2612, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands) 用于作为宿主菌株。用命名为 pPUZZLE (Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010Dec ;150(4):519-29) 的内部设计的载体进行菌株转化, 根据博来霉素抗性选择阳性转化子。对于人血清白蛋白 (HSA) 的分泌表达, 采用其天然分泌前导物。

[0330] b) 新确定的启动子 pCS1 的扩增和克隆进入表达载体。

[0331] 将在实施例 2b 扩增的启动子克隆进入 pPUZZLE 表达载体 pPM1aZ10_HSA, 产生 pPM1aZ10_pCS1_HSA。此外, 包含通常使用的甘油醛 3- 磷酸脱氢酶启动子 (pGAP) 的载体 pPM1aZ10_pGAP_HSA 作为参照。用 ApaI 和 SbfI 限制性位点将该启动子插入 HSA 基因的起始密码子上游 (参见表 3)。通过 Sanger 测序验证该启动子序列的正确性。

[0332] c) 在新确定的启动子 pCS1 的控制下表达毕赤酵母中的 HSA

[0333] 用 AscI 限制性内切酶将全部质粒线性化, 然后电穿孔法导入 *P. pastoris*。在 YPD 平板 (每升含 : 上选择阳性转化子 10g 酵母提取物, 20g 蛋白胨, 20g 葡萄糖, 20g 琼脂糖) 上选择阳性转化子, 平板含 25 μ g/mL 博来霉素。菌落 PCR 用于保证实施例 2c 所述转化质粒的存在。

[0334] 将单菌落接种到液体 YPG-Zeo 培养基作为预培养基, 用于 HSA 表达筛选 (每升含 : 20g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, 12.6g 甘油和 25mg 博来霉素)。大约 24 小时预培养后, 预培养物用于在 BM 培养基 (每升含下列组分 : 20g 蛋白胨, 10g 酵母提取物, 20g 葡萄糖, 13.4g 含硫酸铵的酵母氮源, 0.4mg 生物素和 100mM 磷酸钾缓冲液 pH6.0) 中接种 OD600

为 0.1 的主培养物。用 0.5% 的葡萄糖每隔 12 小时向主培养物补料。在主培养末期取样。通过测定 OD600 或湿细胞重确定了生物量浓度。按照供应商说明书通过人血清白蛋白 ELISA 定量试剂盒 Human Albumin ELISA Quantitation Set (Cat. No. E80-129, Behly Laboratories, TX, USA) 定量测定了培养悬浮液中 HSA 的浓度。HSA 标准采用起始浓度 400ng/mL。相应地,用样品稀释液 (50mM Tris-HCl, 140mM NaCl, 1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) Tween20, pH 8.0) 稀释样品。在表 8 介绍了在 pGAP (1 个 HSA 基因拷贝) 控制下表达 HSA 的克隆筛选的 HSA 滴定量和 9 个在 pCS1 下表达 eGFP 的克隆。所有 pCS1 控制的克隆分泌的 HSA 相当于带 1 个基因拷贝的 pGAP 控制的克隆两倍。如实施例 5 所述确定 HSA 中的 GCN。所有分析的在 pCS1 控制下的克隆在筛选培养中具有 1 拷贝的表达盒 (1GCN), 因此,所有在新 pCS1 启动子控制下的克隆 HSA 分泌量 (mg 分泌的 HSA/g 生物量) 是具有相同 GCN 的 pCS1 克隆的两倍。

[0335]

克隆	HSA (mg/L) 48 小时主培养
pGAP-HSA#3 (1GCN)	32.8
pCS1-HSA	76.5+/-5.0

[0336] 表 8: 筛选培养 48 小时后, pGAP 和 pCS1 控制下的表达 HSA 的毕赤酵母克隆在悬浮液中分泌的 HSA 水平的定量。

[0337] 实施例 4: pCS1 启动子控制下的表达 HSA 的毕赤酵母的分批补料培养

[0338] 为了分析在生产过程类的条件下 pCS1 驱动 HSA 表达的能力, 分批补料培养了 1 个携带 1 拷贝的 HSA 表达盒 (参见实施例 3) 的 pCS1 克隆 (pCS1_HSA#1)。

[0339] 在有效容积为 1.0L 的 DASGIP 生物反应器中进行发酵。按照参考文献培养了两个不同的 pGAP (Prielhofer 等人在 2013. Microb. Cell. Fact. 12:5 所述的有 1 个 HSA 基因拷贝的 pGAP_HSA#3 和具有两个 HSA 基因拷贝的 pGAP_HSA#4) 控制下表达 HSA 的毕赤酵母菌株。

[0340] 使用了如下培养基:

[0341] 每升 PTM₁ 微量元素盐母液含:

[0342] 6.0g CuSO₄ · 5H₂O, 0.08g NaI, 3.36g MnSO₄ · H₂O, 0.2g Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.02g H₃BO₃, 0.82g CoCl₂, 20.0g ZnCl₂, 65.0g FeSO₄ · 7H₂O, 0.2g 生物素和 5.0ml H₂SO₄ (95% -98%)。

[0343] 甘油分批发酵培养基每升含:

[0344] 39.2g 甘油, 27.9g H₃PO₄ (85%), 7.8g MgSO₄ · 7H₂O, 2.6g KOH, 9.5g K₂SO₄, 0.6g CaSO₄ · 2H₂O, 0.4mg 生物素和 4.6mL PTM₁ 微量元素盐母液。灭菌过滤进入发酵罐后调 pH 为 5.85。

[0345] 葡萄糖分批补料培养基每升包含:

[0346] 550g 一水葡萄糖, 6.5g MgSO₄ · 7H₂O, 10g KCl, 0.35g CaCl₂ · 2H₂O, 0.4mg 生物素和 12mL PTM₁ 微量元素盐母液。

[0347] 采用搅拌速度 (400 ~ 1200rpm) 将溶氧控制在 DO = 20%。通气速率为 24L/h 空

气,温度控制在 25℃,而添加 NH_4OH (25%) 将 pH 调到 5.85。

[0348] 为了启动发酵,将 400ml 分批培养基灭菌,过滤到发酵罐,(从预培养)接种毕赤酵母克隆,起始 OD 为 $\text{OD}_{600} = 1$ 。大约 25 小时分批期(到达大约 20g/L 的干物质浓度),继而是葡萄糖分批补料培养 100 小时(恒定补料速率 2g/L,产生最终大约 100g/L 的干物质浓度)。分批培养期间,pH 为 5.85,整个发酵期间保持 5.85。在分批培养和分批补料培养期取样。如实施例 3c 用人血清白蛋白 ELISA 定量试剂盒(Bethyl, Cat. No. E80-129)进行 HSA 浓度定量。

[0349] 如前所示,具有 2 个 HSA 拷贝的 pGAP 克隆分泌相当于具有 1 拷贝的 pGAP 克隆分泌量的两倍。(Prielhofer 等人,2013. Microb. Cell. Fact. 12:5)。与单拷贝 GAP 克隆比较,在 pCS1 控制下分泌 HSA 的两个克隆在分批培养和分批补料培养末期分泌高过 4 倍的 HSA 滴定量(结果如表 9 所示)。与生物量和 GCN 相关,pCS1 克隆产生的分泌的 HAS 的量相当于相同基因拷贝数的 pGAP 克隆的 390%。

[0350]

启动子	GCN	分批培养末期		分批补料培养末期		
		HSA (mg/L)	YDM (g/L)	HSA (mg/L)	YDM (g/L)	P_{GAP} 的 HSA/YPD 百分比
Pcs#1	1	38.1	22.2	377.7	119.9	390.7
Pcs#3	1	8.4	22.1	78.6	97.7	100.0
Pcs#4	2	17.4	24.4	167.7	121.0	172.0

[0351] 表 9:在分批培养末期和分批补料培养末期的悬浮液中酵母干物质浓度和 HSA 滴定量,和在 pCS1 或 pGAP 控制下表达 HSA 的毕赤酵母克隆在生物反应器培养的分批补料末期的 HSA 滴定量/每干物质量。

[0352] 实施例 5:所选克隆的基因拷贝数(GCN)的确定

[0353] 表达强度通常与整合到毕赤酵母基因组的表达盒的数量相关。因此,确定了选择的克隆的基因拷贝数。采用 DNeasy Blood&Tissue Kit(QuiaGen, Cat. No. 69504)分离了基因组 DNA。用定量 PCR 确定了基因拷贝数。因此,采用了 SensiMix SYBR Kit(Bioline, QT605-05)。将荧光染料 Sensi Mix SYBR 分别与引物(Prielhofer 等人给出,2013. Microb. Cell. Fact. 12:5)和样品混合,用于实时 PCR 的实时分析(Rotor Gene, Qiagen)。所有样品实施一式三份或一式四份分析。采用 Rotor Gene 软件进行数据分析。

[0354] 实施例 6:用猪的羧肽酶基因 B(CpB)作为胞外表达的报告基因,对新识别的毕赤酵母启动子 pCS1 进行启动子活性比较研究

[0355] 为了分析新识别的启动子的特性,实施如下摇瓶筛选:用含甘油作为碳源的丰富培养基预培养 24 小时,继而用丰富培养基进行主培养。

[0356] a) 菌株 & 表达载体

[0357] 毕赤酵母野生型菌株(CBS2612, CBS--KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)用于作为宿主菌株。用内部设计的命名为 pPUZZLE(Stadlmayr et al. J. Biotechnol 2010;Dec;

150(4):519-29) 的载体转化菌株,根据博来霉素抗性选择阳性转化子。使用酵母 α -交配因子前导肽进行猪的羧肽酶 B(CpB) 的分泌表达。

[0358] b) 新识别的启动子 pCS1 在内部设计的表达载体中的扩增和克隆。

[0359] 将在实施例 2b 扩增的启动子克隆到 pPUZZLE 表达载体 pPM1aZ30_aM F_CpB,产生 pPM1aZ30_pCS1_aMF_CpB。此外,将包含通常使用的甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子 (pGAP) 的载体 pPM1dZ30_pGAP_CpB 作为参照。用 ApaI 和 SbfI 限制性位点将该启动子插入到 CpB 基因的起始密码子的上游。通过 Sanger 测序验证该启动子序列的正确性。

[0360] c) 在新确定的葡萄糖限制性诱导启动子控制下毕赤酵母表达 CpB

[0361] 用 AscI 限制性内切酶将质粒线性化,然后电穿孔法(采用适合毕赤酵母的标准转化方法)导入毕赤酵母。在每升含下列组分的 YPD 平板上选择阳性转化子:10g 酵母提取物,20g 蛋白胨,20g 葡萄糖,20g 琼脂,平板含 25 μ g/mL 博来霉素。使用菌落 PCR 保证如实施例 2c 所述转化质粒的存在。

[0362] 接种单菌落到液体 YPG-Zeo(每升含下列组分:20g 蛋白胨、10g 酵母提取物、12.6g 甘油和 25mg 博来霉素)作为预培养,用于 CpB 表达筛选。大约 24 小时后,预培养物用于将主培养物(OD600 = 1)接种到 YPD 培养基中(每升含下列组分:20g 蛋白胨,10g 酵母提取物,20g 葡萄糖)。每隔 12 小时向主培养物中流加 0.5% 的葡萄糖。在预培养末期以及接种主培养物 24 小时和 48 小时后取样。通过测定 OD600 和细胞湿重确定生物量浓度。根据 CpB 的马尿酸-L-精氨酸向马尿酸的转化,通过酶分析定量培养悬浮物中的 CpB 浓度。开始反应时,通过采用 Hitachi U-2910 分光光度计检测在 25 $^{\circ}$ C,254nm 的光吸收值测量反应动力学。用分析缓冲液(25mM Tris,100mM HCl,pH 7.65)缓冲样品和标准品,并用激活缓冲液(0.01mg/L 胰蛋白酶,300mM Tris,1 μ M ZnCl₂,pH 7.65)激活。使用不含胰蛋白酶的激活缓冲液代替样品作为阴性对照。通过添加底物溶液(1mM 的马尿酸-L-精氨酸溶于分析缓冲液)启动反应。

[0363] d) 在 pCS1 启动子控制下的表达 CpB 毕赤酵母菌株的分批补料培养。如实施例 2d 所述用培养基进行实施例 4 所述的分批补料发酵。

[0364] 实施例 7:用人血清白蛋白(HSA)作为胞外表达的报告基因,对新识别的毕赤酵母多拷贝克隆中的启动子 pCS1 进行比较启动子活性研究

[0365] 为研究更高的 GCN 是否可进一步提高 HSA 的产量,通过 Marx 等人(2009)所述的转化后载体扩增方法扩增表达 HSA 的 P_{CS1} 克隆。通过同源重组整合到 rDNA 基因座产生载体。通过逐步提高的抗体浓度选择扩增。

[0366] a) 菌株 & 表达载体

[0367] 毕赤酵母野生型菌株(CBS2612,CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre,Centraalbureau voor Schimmelcultures,Utrecht,The Netherlands)用于作为宿主菌株。用包含核糖体 DNA 座的 NTS 区作为整合位点(Marx 等人,2009.FEMS Yeast Res. 9(8):1260-70.)的载体 pPUZZLE 的变种转化菌株。根据博来霉素抗性选择阳性转化子。使用其天然分泌前导肽来分泌表达人血清白蛋白(HSA)。

[0368] 将实施例 2b 扩增的 pCS1 启动子克隆到 pPUZZLE 表达载体 pPM1nZ30_HSA,产生 pPM1nZ30_pCS1_HSA。

[0369] 用 ApaI 和 SbfI 限制性位点将该启动子插入到 HSA 基因的起始密码子的上游。通

过 Sanger 测序验证该启动子序列的正确性。

[0370] c) 在新确定的启动子 pCS1 控制下的转化后载体扩增和毕赤酵母的 HSA 表达

[0371] 用 SpeI 限制性内切酶将质粒线性化,然后用电穿孔法(采用适合毕赤酵母的标准转化方法)导入毕赤酵母。在每升含下列组分的 YPD 平板上选择阳性转化子:10g 酵母提取物,20g 蛋白胨,20g 葡萄糖,20g 琼脂,平板含 25 μ g/mL 博来霉素。菌落 PCR 保证如实施例 2c 所述转化质粒的存在。如 Marx 等(FEMS Yeast Res. 2009Dec ;9(8):1260-70)所述通过在包含更高的博来霉素浓度(50, 100 和 500 μ g/mL 博来霉素)的 YPD 琼脂平板上对克隆重复划线扩增基因拷贝数。

[0372] 如实施例 3c 所述通过 HSA ELISA 实施 HSA 表达筛选和产物定量分析。如实施例 5 所述用最高 HSA 分泌水平确定某些克隆的 GCN。扩增 GCN 的 P_{cs1}克隆和具有已知 GCN(1 个或 2 个)的 P_{GAP}和 P_{cs1}克隆作为对照,在 BM 培养基上培养 48 小时。

[0373] 通过提高 HSA GCN,也提高了 HSA 的分泌水平(如表 10 所示)。与单拷贝克隆比较,在含 3 个 HSA 基因拷贝的 pCS1 控制下表达 HSA 的多拷贝克隆每 WCW 产生 2 倍或 3 倍量的 HSA。在如实施例 4 所述的分批补料生物反应器培养中,也可预期多拷贝 pCS1 克隆的生产率具有类似的提升。

[0374]

克隆	HSA (μ g)/WCW(g)	GCN	HSA (μ g)/WCW(g)/GCN
pGAP-HSA#3	291.0	1	291.0
pGAP-HSA#4	476.2	2	238.1
pGAP-HSA#1	540.7	1	540.7
pCS1-HSA#1-25-100#7	1464.1	3	488.0
pCS1-HSA#1-50-100#5	1178.3	4	294.6
pCS1-HSA#1-50-100#9	1580.7	3	526.9

[0375] 表 10:在 pGAP 或 pCS1 控制下单和多拷贝克隆的 HSA 表达的筛选结果。显示了 GCN 和每 GCN 的滴度。

[0376] 实施例 8:用抗体片段(Fab)作为胞外表达的报告基因,对新识别的毕赤酵母启动子 pCS1 进行启动子活性比较研究

[0377] 为了分析新识别的启动子的特性,实施如下摇瓶筛选:用含甘油作为碳源的丰富培养基预培养 24 小时,继而用丰富培养基进行主培养。

[0378] a) 菌株 & 表达载体

[0379] 毕赤酵母野生型菌株(CBS2612, CBS--KNAW Fungal Biodiversity Centre, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands)用于作为宿主菌株。将实施例 2b 中扩增的 pCS1 启动子克隆进入含 HyHEL 抗体的 LC 或含 Fab-HC 作为 GOI 的 pPUZZLE 表达载体。用 ApaI 和 SbfI 限制性位点将该启动子插入到 Fab 基因的起始密码子的上游。测序验证后,通过使用兼容性限制性内切酶 MreI 和 AgeI 将两条链的表

达盒结合到一个载体上。

[0380] b) 新识别 pCS1 启动子控制下 Fab 在毕赤酵母中的表达。

[0381] 用 AscI 限制性内切酶将质粒线性化,然后用电穿孔法(采用适合毕赤酵母的标准转化方法)导入毕赤酵母。在每升含下列组分的 YPD 平板上选择阳性转化子:10g 酵母提取物,20g 蛋白胨,20g 葡萄糖,20g 琼脂),平板含 25 μ g/mL 博来霉素。菌落 PCR 保证如实施例 2c 所述转化质粒的存在。

[0382] Fab 的表达筛选与实施例 3c 所述 HSA 表达筛选类似。采用抗人 IgG 抗体 (Abeam ab7497) 作为包被抗体 (1:1000),和一种山羊抗人 Kappa 轻链 (结合的和自由的)-碱性磷酸酶结合的抗体 (Sigma A3813) 作为检测抗体 (1:1000) 的 ELISA 定量检测完整的 Fab 的量。人 Fab/Kappa, IgG 片段 (Bethyl P80-115) 用作标准,初始浓度为 50ng/mL。相应地稀释悬浮培养物样品。用 pNPP 底物 (Sigma S0942) 实施检测。在 PBS (2mM KH_2PO_4 , 10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.7mM g KCl, 8mM NaCl, pH 7.4) 基础上制备包被,稀释,洗涤缓冲液,相应地用 BSA (1% (w/v)) 和 / 或 Tween 20 (0.1% (v/v)) 完成。

[0383] 从选择的克隆分离了基因组 DNA,并如实施例 5 所述确定重链 (HC) 和轻链 (LC) 的 GCN。GCN 与克隆 PCS1#5 相关联,因此设定了 HC 和 LC 的 GCN。Fab 表达产量 (μ g Fab/g WCW),相关的 GCN 和每个 GCN 的 Fab 产量示于表 11。关于其他模式蛋白,与在 pGAP 控制下的表达克隆比较,每个在 pCS1 控制下表达的克隆的每个 GCN 的 Fab 产量大约是前者两倍 (平均 35.4 μ g Fab/gWCW)。

[0384]

克隆	Fab (μ g)/WCW(g)	与 pCS1-Fab#5 相关的 GCN		每个 GCN 的 Fab 产量 [Fab (μ g)/WCW(g)]	
		重链	轻链	重链	轻链

[0385]

pGAP-Fab#34	73.3	4	3	18	24
pCS1-Fab#2	35.9	1	1	36	36
pCS1-Fab#4	66.8	2	2	33	33
pCS1-Fab#5	34.7	1	1	34.7	34.7
pCS1-Fab#7	37.5	1	1	38	37.5

[0386] 表 11:在 pGAP 或 pCS1 控制下的 Fab 表达的筛选结果。GCN 和每个 GCN 的 Fab 产量显示在右边。

[0387] c) 在 pCS1 启动子控制下表达 Fab 的毕赤酵母菌株的分批补料培养。

[0388] 按照实施例 4 所述的相似条件,采用实施例 2d 所述的培养基实施分批补料培养发酵。

[0389] 与 pGAP 比较,在生物反应器培养中,在 pCS1 控制下的 Fab 的表达产生 3.0 倍的特定产量 (qP/GCN) (参见表 12)。

[0390]

克隆	Fab 产量 [Fab (mg) /DCW (g)]	Qp [Fab (μg) /DCW (h)]	与 pCS1- Fab#5 相关 的 GCN		qP/GCN	
			重链	轻链	重链	轻链
pGAP- Fab#34	0.220	2.18	4	3	0.55	0.73
pCS1-Fab#4	0.262±0.000	3.51±0.14	2	2	1.76	1.76
pCS1-Fab#5	0.178	2.54	1	1	2.54	2.54

[0391] 表 12 :在 pGAP 或 pCS1 控制下的 Fab 表达的的生物反应器培养的结果。显示了分批补料培末期的 Fab 产量,平均特异性产量 qP (整个分批补料期每单位生物量 (干细胞重量 DCW) 的平均 Fab 产率),各个克隆的相关 GCN,和平均 qP/GCN。

[0392] 实施例 9 :pCS1 变种的比较

[0393] 如实施例 2a 所示克隆了 pCS1 启动子的长度变种,并如实施例 2c 所述筛选了相似变种。用 pCS1 (标准长度) 和 pGAP 控制的克隆表达做对照。pCS1 的正向引物和长度及其变种列于表 13。

[0394]

变种	正向引物	长度 (bp)
pCS1 (标准) SEQ ID 1	GATAGGGCCCCAGGGATCATTGAGGTTTCCAC SEQ ID 16	985
pCS1-1488 SEQ ID 2	GATAGGGCCCGATAGTTCTAGAAGACCTGGCGTCG SEQ ID 17	1488

[0395]

pCS1-767F SEQ ID 3	GATAGGGCCCAGCCAACCATCTTTGTTTCG SEQ ID 18	767
pCS1-500F SEQ ID 4	GATAGGGCCCGTGGTTTCCAGGACAACACCC SEQ ID 19	500
pCS1-344F SEQ ID 5	GATAGGGCCCGACCGCAATTCACCATGATGC SEQ ID 20	344
pCS1-234F SEQ ID 6	GATAGGGCCCAGCCTGCTTCATTCTTGCC SEQ ID 21	234
pCS1 138F SEQ ID 7	GATAGGGCCCCCGCGAAAAAGGTTTGTATTATAG SEQ ID 22	138
pCS1 85F SEQ ID 8	GATAGGGCCCCATACTCTCCTCCCCCCCCTG SEQ ID 23	85

[0396] 表 13 :pCS1 及其变种 :pCS1 的长度变种 (SEQ ID 1) 的正向引物和长度。

[0397] 在 pGAP、pCS1 或 pCS1 控制下的表达 eGFP 的克隆的筛选表明,pCS1 产生最佳活性

需要大约至少 500bp 的长度。更短的 pCS1 变种随着长度降低,活性降低(参见表 14)。

[0398]

克隆	24 小时的 FL/ 细胞	48 小时的 FL/ 细胞
pGAP-eGFP#2	15.39	17.59
pGAP-eGFP#4	25.30	37.77
pCS1-85pool	-0.15	0.04
pCS1-138pool	7.70	6.30
pCS1-234pool	18.57	19.71
pCS1-344pool	25.19	27.63
pCS1-500pool	28.50	38.82
pCS1-767pool	26.88	36.47
pCS1-1488pool	30.59	44.40

[0399] 表 14 :在 pGAP, pCS1 或 pCS1 变种控制下的 eGFP 表达的筛选结果(相对荧光)

[0400] 实施例 10 :在高生长速率和低生长速率的生长限制条件下,在由启动子控制表达 eGFP 的克隆中,该启动子的表达强度验证。

[0401] a) 菌株

[0402] 用一个在感兴趣的启动子的控制下表达 eGFP 的宿主菌株(例如毕赤酵母)和在 pGAP 控制下表达 eGFP 的菌株比较表达水平。

[0403] b) 用于启动子比较的 eGFP 表达菌株的培养。

[0404] 在恒化器中用有效容积为 1.0L 的 DASGIP 生物反应器在两个固定的特别生长速率(通过设定稀释率,调节为一个高,一个低的特别生长率)下培养这些菌株。

[0405] 使用下列培养基:

[0406] 每升 PTM1 微量元素盐母液含:

[0407] 6.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.08g NaI , 3.36g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02g H_3BO_3 , 0.82g CoCl_2 , 20.0g ZnCl_2 , 65.0g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g 生物素和 5.0ml H_2SO_4 (95% -98%)。

[0408] 甘油分批发酵培养基每升含:

[0409] 2g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 39.2g 甘油, 12.6g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.9g KCl , 0.022g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4mg 生物素和 4.6ml PTM1 微量元素盐母液。添加 HCl 调 pH 为 5。

[0410] 恒化器培养基每升包含:

[0411] 2.5g 一水柠檬酸 ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 55.0g 一水葡萄糖, 21.75g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1.0g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5g KCl , 0.04g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.4mg 生物素和 2.43ml PTM1 微量元素盐母液。

添加 HCl 调 pH 为 5。

[0412] 采用搅拌速度 (400–1200rpm) 将溶氧控制在 $DO = 20\%$ 。通气速率为 24L/h 空气, 温度的控制在 25°C , 而添加 NH_4OH (25%) 将 pH 调到 5。为了启动发酵, 将 400ml 分批培养基灭菌, 过滤到发酵罐, (从预培养物) 接种毕赤酵母克隆, 起始 OD 为 $OD_{600} = 1$ 。大约 25 小时分批期 (到达大约 20g/L 的干物质浓度), 继而是葡萄糖限制的恒化器发酵培养 (20g/L) 恒化器的补料速率和收获速率用于保持需要的恒定的特别的生长速率。在培养期间, 为了保证恒定的生长率, 保持培养液容积和细胞干重恒定。分别在 0.15 和 0.015/h 的高和低细胞生长率进行细胞培养。因此, 补料 / 收获速率分别控制在 $150\text{mLh}^{-1}\text{L}^{-1}$ (每升培养液每小时补充的恒化器培养基 mL 数) 和 $15\text{mLh}^{-1}\text{L}^{-1}$ 。

[0413] c) 取样

[0414] 在稳定状态 (至少交换 5 个体积) 时取样, 并用读板器 (Infinite 200, Tecan, CH) 分析 eGFP 表达。因此, 将样品稀释到 $OD_{600} = 5$ 。发酵培养一式两份。如实施例 2d 所述, 采用计算每个生物反应器的相对荧光比较表达数据。

[0415] 实施例 11 : 高和低的特别生长速率下实现高速转录的毕赤酵母启动子的确定

[0416] 为了确定高和低的特别生长速率下实现高速转录的毕赤酵母启动子, 用 DNA 基因芯片分析了基因表达谱。从转录组数据选择了高和低的特别生长速率下的高速转录基因。因此, 毕赤酵母细胞是在分别在实施例 10b 所述的恒化器内在 0.15 和 0.015h^{-1} 的高和低的特别生长速率下培养。如实施例 1c)、1d)、1e) 和 1f) 所述实施取样, RNA 纯化, 基因芯片杂交样品的制备, 基因芯片分析, 数据采集和统计评价。通过浏览在低和高生长速率条件下具有高信号强度的基因芯片数据确定了高和低的生长速率下高速转录的基因和具体启动子。作为第二标准, 在两种条件下, 信号强度应高于那些甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAP, 又名 GAPDH 和 TDH3) 基因。为了分离启动子, 扩增了相应基因的起始密码子 ATG 上游大约 1000bp 的核酸片段。

[0001]

序列表

<110> 龙沙有限公司 (Lonza Ltd.)

<120> 组成型启动子

<130> L0003P

<160> 24

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 985

<212> DNA

<213> 毕赤酵母

<400> 1

```

agggcacat tgaggittcc acaaaaggaa gaaacatgga tccagagaca tcaacagaga      60
ggaaagcggg tagtgaagcc gaagccacaa cacagcccga ttggaaggg agttcacaaat    120
caaggtgagt ccagccattt tttttctttt tttttttttt attcaggtga acccacctaa    180
ctatttttaa ctgggatcca gtgagctcgc tgggtgaaag ccaacctctt ttgtttcgg      240
ggaaccgtgc tgcgcccgta aagtttaatt tttttcccg cgcagcttta atctttcggc    300
agagaaggcg ttttcacgtg agcgtgggaa cagaataatc agttcatgtg ctatacagge    360
acatggcagc agtcactatt ttgcttttta accttaaagt cgttcaccaa tcattaaactg    420
accaatcaga ttttttgcat ttgccactta tctaaaaata cttttgtatc tcgcagatac    480
gttcagtggt ttccaggaca acacccaaaa aaaggatatc atgccactag gcagtcgggt    540
ttatttttgg tcacccacgc aaagaageac ccacctcttt taggttttaa gttgtgggaa    600
cagtaacacc gcctagagct tcaggaaaaa ccagtacctg tgaccgcaat tcaccatgat    660
gcagaatgtt aatttaaacg agtgccaaat caagattica acagacaaat caatcgatcc    720
atagttaccc attccagcct tttcgtcgtc gagectgctt cattcctgcc tcagggtgat    780
aactttgcat gaaaagtcca gattagggca gattttgagt ttaaaatagg aaatataaac    840
aaatataccg cgaaaaaggt ttgtttatag cttttcgcct ggtgccgtac ggtataaata    900
catactctcc tccccccctt ggttctcttt ttcttttggt acttacattt taccgttcgc    960
tcactcgttt cactcaacaa caaaa

```

<210> 2

<211> 1488

<212> DNA

<213> 毕赤酵母

<400> 2

```

gatagttcta gaagacctgg cgtcgttggt caactactcg ttccacaagt tgacaaagac      60
ttttaccaag agaagagcag ttgtcaccga ccacaataac aacctggaag ccgagaaaaa    120
acttggaaac tccaagggtg gactgcctag aaatccgtac tctggcgccg ategaagact    180
gcattttctc caagaattga tgcctatggt ctcattcttac aatcgcaaac acaacagtgt    240
cagttctctt tgcggtccct tgaacacaa ccaaccgaaag gtggggaagt ctaatgtcac    300
gcaaacgata ttgcaaccaa tgttgggctc tactggcgctc ttgctgcata aaatagctga    360
tcggttcgta atcttcaaag attggtgtag gacgaacgag tctgctgggc tacaagtitt    420
gccecatatc gctgttcaag ccaacccgcg gaatcccaaa acaccccatc cgacaaaagt    480

```

[0002]

```

tgtttgtttc agcagatcta gggagggeat cattgaggtt tccacaaaag gaagaaacat      540
ggatccagag acatcaacag agaggaaagc gggtagtgaa gccgaagcca caacacagcc      600
cgatttggaa gggagttcac aatcaagggtg agtccagcea ttttttttct tttttttttt      660
ttttatcagg tgaacccecc taactatitt taacigggat ccagtgaget cgtcgggiga      720
aagccaacca tcitttgttt cggggaaccg tgcgcceccc gtaaagttaa ttttttttcc      780
ccgcgcagct ttaattcttc ggcagagaag gcgttttcat cgtagcgtgg gaacagaata      840
atcagttcat gtgcataaca ggcacaiggc agcagtcact atttgccttt ttaaccttaa      900
agtcgttcat caatcattaa ctgaaccaate agattttttg catttgcac ttatctaaaa      960
atacttttgt atctgcaga tacgttcagt ggtttccagg acaacaccca aaaaaaggta     1020
tcaatgccac taggcagtcg gtittatttt tggtcaccea cgcaaagaag caccacaccc     1080
tttttaggtt taagttgttg gaacagtaac accgcctaga gcttcaggaa aaaccagtac     1140
cigtgaccgc aattcaccat gatgcagaat gtttaattta acgagtgcca aatcaagatt     1200
tcaacagaca aateaatcga tccatagtta cccattccag ccttttcgtc gtcagacctg     1260
cttcattcct gccgcagggt cataactttg catgaaaagt ccagattagg gcagattttg     1320
agtttaaaat aggaatatata aacaaatata ccgcgaaaaa ggtttgttta tagcttttcg     1380
cctggtgcgg tacggtataa atacatactc tectcecccc cctggttctc tttttctttt     1440
gttacttaca ttttaccglt ccgtcactcg ctteactcaa caacaaaa      1488

```

<210> 3
 <211> 767
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 3
agccaaccaa cttttgttcc ggggaaccgt gctgcceccg taaagttaat tttttttcc      60
cgcgcagctt taatctttcg gcagagaagg cgttttctac gtagegtggg aacagantaa     120
tcagttcatg tgctatacag gcacatggca gcagtcacta ttttgccttt taaccttaaa     180
gtcgttctac aatcattaac tgaccaatca gattttttgc atttgcact tatctaaaaa     240
tacttttgta tctgcagat acgttcagtg gtttcagga caacacccaa aaaaaggat      300
caatgccact aggcagtcgg ttttattttt ggtcacccac gcaaagaagc acccaccctt     360
tttaggtttt aagttgtggg aacagtaaca ccgcctagag cttcaggaaa aaccagtacc     420
tgtgaccgca attcaccatg atgcagaatg ttaatttaaa cgagtgccaa atcaagattt     480
caacagacaa atcaatcgat ccatagttae ceattccagc cttttcgtcg tcgagccfgc     540
ttcattctcg cctcaggtgc ataactttgc atgaaaagtc cagattaggg cagattttga     600
gtttaaaata ggaaatataa acaaatatac ccgcgaaaaa gtttgtttat agcttttcgc     660
cigggtccgt acggtatataa tacatactct cctccccccc ctggtctctt ttttcttttg     720
ttacttacat tttaccgttc cgtcactcgc ttactcaac aacaaaa      767

```

<210> 4
 <211> 500
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 4
gtggtttcca ggacaacacc caaaaaaagg tatcaatgcc actaggcagt cggttttatt      60

```

[0003]

```

tttggteacc caccgaaaga agcaccaccacc ttttttaggt ttttaagttgt gggaacagta      120
acaccgccta gagcttcagg aaaaaccagt accigtgaacc gcaattcacc atgatgcaga      180
atgttaattt aaacgagttgc caaatcaaga ttccaacaga caaatcaatc gatccatagt      240
taccctatcc agccttttcg tegtgcagcc tgccttcattc ctgectcagg tgcataactt      300
tgcataaaaa gtccagatta gggcagattt tgagttttaa ataggaaaata faaacaataa      360
taccgcgaaa aaggtttgtt tatagctttt cgcctgggtgc cgtacgggtat aaatacatac      420
tctctctccc cccctgggtc tctttttctt ttgttactta cattttaccg ticcgtcact      480
cgcttcactc aacaacaaaa                                500

```

<210> 5
 <211> 344
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 5
gaccgcaatt caccaatgag cagaatgta atttaaacga gtgccaaatc aagatttcaa      60
cagacaaatc aatcgatcca tagttaacca ttccagcctt ttctgtctcg agcctgettc      120
attcctgcct caggtgcata actttgcatg aaaagtccag attagggcag attttgagtt      180
taaaatagga aatataaaca aatataccgc gaaaaagggt ttgtttatagc ttttcgcctg      240
gtgccgtacg gtataaatac atactctcct cccccccctg gttctctttt tcttttgta      300
cttacatttt accgttccgt cactcgttc actcaacaac aaaa                                344

```

<210> 6
 <211> 234
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 6
agcctgettc attcctgcct caggtgcata actttgcatg aaaagtccag attagggcag      60
attttgagtt taaaatagga aatataaaca aatataccgc gaaaaagggt ttgtttatagc      120
ttttcgcctg gtgccgtacg gtataaatac atactctcct cccccccctg gttctctttt      180
tcttttgta cttaacatttt accgttccgt cactcgttc actcaacaac aaaa                                234

```

<210> 7
 <211> 138
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 7
ccgcgaaaaa ggtttgttta tagcttttcg cctgggtccg tacggtataa atacatactc      60
tctctcccc cctgggttc tttttctttt gttaacttaca ttttaaccgtt ccgtcactcg      120
cttaactcaa caacaaaa                                138

```

<210> 8
 <211> 85
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 8
catactctcc tccccccct gggtctcttt ttcttttgtt acttacattt taccgttccg      60
tcactcgttt cactcaacaa caaaa                                85

```

[0004]

<210> 9
 <211> 408
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

 <400> 9
 atgcaattct ctatcgtegc tactttgget ctgctgggtt ccgetctggc tgcctactct 60
 aacgtaactt acacttacga gactaccaic accgaigtg tcaccgagct caccacttac 120
 tgcccagage caaccacott cgttcacaag aacaagacca tcactgtgac cgccccaacc 180
 actttgacca tcaetgactg tccttgcaac atctccaaga ccaccaagat caccactgat 240
 gtccacacaa caccaccac caccacacac accaccacca etcacgtgcc atctacctct 300
 accccagctc caaccacac tgtttctacc atctctcagc gtgggtgctg taaggctggt 360
 gttgctgggt tggccggtgt tgcgtctgcc gctgcttact tcttgtaa 408

<210> 10
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> 毕赤酵母

 <400> 10
 Met Gln Phe Ser Ile Val Ala Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ala Leu
 1 5 10 15

 Ala Ala Tyr Ser Asn Val Thr Tyr Thr Tyr Glu Thr Thr Ile Thr Asp
 20 25 30

 Val Val Thr Glu Leu Thr Thr Tyr Cys Pro Glu Pro Thr Thr Phe Val
 35 40 45

 His Lys Asn Lys Thr Ile Thr Val Thr Ala Pro Thr Thr Leu Thr Ile
 50 55 60

 Thr Asp Cys Pro Cys Thr Ile Ser Lys Thr Thr Lys Ile Thr Thr Asp
 65 70 75 80

 Val Pro Pro Thr Thr His Ser Thr Pro His Thr Thr Thr Thr His Val
 85 90 95

 Pro Ser Thr Ser Thr Pro Ala Pro Thr His Ser Val Ser Thr Ile Ser
 100 105 110

 His Gly Gly Ala Ala Lys Ala Gly Val Ala Gly Leu Ala Gly Val Ala
 115 120 125

 Ala Ala Ala Ala Tyr Phe Leu
 130 135

<210> 11
 <211> 402
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

 <400> 11
 atgcaattct ctatcgtegc tactttgget ctgctgggtt ccgetctggc tgcctactct 60
 aacgtaactt acacttacga gactaccaic accgaigtg tcactgagtt gaccacttac 120

[0005]

```

tgcaccagagc caaccaacctt tgtttacaag aacaagacca tcaccgtgac tgagccaacc 180
actttgacca tcactgactg cccaigcacc atctcaaaga ccaccaagat caccactgat 240
gttccaccaa ccacccacgt caccccatcc accactcaeg tgccatctac ctctacccca 300
getccaaccc actctgtttc taccatctct caccgtggig ctgctaagge tggigtgtgt 360
ggtttggcgg gtgttgetgc tgccgetgct tactttctgt aa 402

```

<210> 12
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 毕赤酵母

<400> 12

```

Met Gln Phe Ser Ile Val Ala Thr Leu Ala Leu Ala Gly Ser Ala Leu
1           5           10           15

```

```

Ala Ala Tyr Ser Asn Val Thr Tyr Thr Tyr Glu Thr Thr Ile Thr Asp
20           25           30

```

```

Val Val Thr Glu Leu Thr Thr Tyr Cys Pro Glu Pro Thr Thr Phe Val
35           40           45

```

```

Tyr Lys Asn Lys Thr Ile Thr Val Thr Glu Pro Thr Thr Leu Thr Ile
50           55           60

```

```

Thr Asp Cys Pro Cys Thr Ile Ser Lys Thr Thr Lys Ile Thr Thr Asp
65           70           75           80

```

```

Val Pro Pro Thr Thr His Val Thr Pro Ser Thr Thr His Val Pro Ser
85           90           95

```

```

Thr Ser Thr Pro Ala Pro Thr His Ser Val Ser Thr Ile Ser His Gly
100          105          110

```

```

Gly Ala Ala Lys Ala Gly Val Ala Gly Leu Ala Gly Val Ala Ala Ala
115          120          125

```

```

Ala Ala Tyr Phe Leu
130

```

<210> 13
 <211> 491
 <212> DNA
 <213> 毕赤酵母

```

<400> 13
cttttttgta gaaatgtctt ggtgtcctcg tccaatcagg tagccatctc tgaaatatct 60
ggctccgltg caactccgaa cgacctgcig gcaacgtaaa attctccggg gtaaaactta 120
aatgtggagt aatggaacca gaaacgtctc ttcctttctc tctcttcca ccgcccgta 180
cgtccctag gaaattttac tctgtggag agctttctct acggccccct tgcagcaatg 240
ctcttcccag callacgttg cgggtaaaaa ggaggtcgig taaccgacct agcagcccg 300
ggaatgaaaa gtcccgccg togttgcaa taatagcggg cggacgcatg tcatgagatt 360
attggaaacc accagaatcg aatataaaag gcaaacacct ttcccaattt tggtttctcc 420
tgacccaaag actttaaatt taatttattt gtccctattt caatcaattg aacaactatc 480

```

[0006]

acctgcaggc c	491
<210> 14	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 14	
gatagggcc cagggcatca ttgaggtttc cac	33
<210> 15	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 15	
gataacctgca ggttttgttg ttgagtgaag cgagtg	36
<210> 16	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 16	
gatagggcc cagggcatca ttgaggtttc cac	33
<210> 17	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 17	
gatagggcc gatagttcta gaagacctgg cgtcg	35
<210> 18	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 18	
gatagggcc agccaacct cttttgtttc g	31
<210> 19	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 19	
gatagggcc gtggtttcca ggacaacacc c	31

[0007]

<210> 20	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 20	
gatagggcc gcccgcaatt caccatgatg c	31
<210> 21	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 21	
gatagggcc agcctgcttc attcctgcc	29
<210> 22	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 22	
gatagggcc ccgcgaaaaa ggcttgctta tag	33
<210> 23	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 23	
gatagggcc catactctcc tccccccct g	31
<210> 24	
<211> 345	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 翻译的融合伴侣	
<400> 24	
ggccattacg gccgggggac ttacatttta ccgttcctgc actcgttca ctcaacaaca	60
aaaatgcaat tctctatcgt cgtactttg gctcttctg gttccgtct ggctgcttac	120
tctaacgtaa cttaactta cgagactacc atcaccgatg ttgtcaccga gctcaccact	180
tactgccag agccaaccac ctctgttca aagaacaaga ccatcactgt gaccgcccc	240
accactttga ccatcactga ctgtcttgc accatctcca agaccaacca gataccact	300
gatgttccac caaccacca ctccacca ctggccgcct cggcc	345

[illegible][illegible][illegible]

图 1

SEQ ID 13

CTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCT
CCGTTGCAACTCCCAACGACCTGCTGCCAACGTAAAATTCTCCGGGTAAAACCTTAAATGTGGA
GTAATGGAACCCAGAAACGTCTCTTCCCTTCTCTCTCTCTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGA
AATTTTACTCTIGCTGGAGAGCTTCTTCTACGSCCCCTTGCAGCAATGGTCTTCCAGCATTAC
GTTGCCGGTAAAACGGAGGTCTGTACCCGACCTAGCAGCCCAGGGATGSAAAAGTCCCGGCCG
TCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGAGATTATTGGAACCCACAGAATCGAATA
TAAAAGGCGAACACCTTTCCTCAATTTGGTTTCTCCTGACCCAAAGACTTTAAATTTAATTTAT
TTCTCCCTATTTCATCAATTGAACAACCTATCAGCTGCAGGCC

图 3

1. 一种分离的 pCS1 启动子核酸序列,其是一种包含 pCS1 启动子核酸序列 (SEQ ID 1) 的毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 的天然序列,或者是所述天然序列的有功能活性的变种;所述有功能活性的变种是一种长度变种、一种突变体或 SEQ ID 1 的杂合序列,或其结合;所述 pCS1 启动子核酸序列长度为 200 ~ 1500bp,并且至少 60% 的序列与所述 SEQ ID 1 所示序列同源。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸序列,其由所述 pCS1 核酸序列 (SEQ ID 1 所示) 组成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的核酸序列,其中,所述有功能活性的变种表现出与所述 pCS1 核酸序列 (SEQ ID 1) 实质相同的活性。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的核酸序列,其中,所述有功能活性的变种是

a) 一种 SEQ ID 1 的长度变种,优选包含选自由 SEQ ID 2、3、4、5 和 6 组成的组的核酸序列或由所述核酸序列组成,最优选地,所述核酸序列由 SEQ ID 2、3、4、5 或 6 组成;

b) 一种 SEQ ID 1 的突变体,或一种 a) 的长度变种的突变体,该突变体与所述序列 SEQ ID 1 或所述长度突变体具有至少 60% 的同源性;

c) 一种杂合序列,包含:

——一种选自由 SEQ ID 1、一种 a) 的长度变种和一种 b) 的突变体组成的组的序列,和

——至少一种选自由 SEQ ID 1、a) 的长度变种、b) 的突变体和一种异源序列组成的组的进一步的序列;或

d) 一种在严谨条件下杂交到所述长度变种或所述 a) 或 b) 的突变体中的任一项的序列。

5. 根据权利要求 1 至 4 的任一项所述的核酸序列,其中,所述有功能活性的变种选自由以下序列组成的组:

I) 通过修饰 SEQ ID 1 所示的核苷酸序列或其长度变种,通过插入、删除或替换所述序列内的或所述序列的一个或两个末端的一个或多个核苷酸获得的同源序列;和

II) 源自毕赤酵母之外的种的类似物。

6. 根据权利要求 1 ~ 5 中的任一项所述的核酸序列,其通过可操作地与编码感兴趣的蛋白 (POI) 的核苷酸序列连接,其核酸与所述编码所述 POI 的核苷酸序列并非天然相关。

7. 根据权利要求 6 所述的核酸序列,其进一步包含编码产生 POI 分泌的信号肽的核酸序列,优选地,其中编码所述信号肽的核酸序列定位于与所述编码 POI 的核苷酸序列的 5' 端相邻。

8. 一种包含权利要求 1 至 7 中的任一项所述核酸序列的表达构建物,优选一种自主复制的载体或质粒,或一种整合到宿主细胞的染色体 DNA 内的表达构建物。

9. 一种重组子宿主细胞,其包含权利要求 1 至 7 中的任一项所述的核酸序列或权利要求 8 所述的表达构建物,优选一种真核细胞,更优选一种酵母或丝状真菌细胞,更优选一种酵母属或毕赤酵母属的酵母细胞。

10. 权利要求 9 所述的重组子宿主细胞,包含所述核酸序列的多拷贝,和 / 或所述表达构建物的多拷贝。

11. 权利要求 9 或 10 所述的重组宿主细胞,其选自由哺乳动物、昆虫、酵母、丝状真菌和植物细胞组成的组,优选一种酵母,更优选毕赤酵母菌株 CBS 704、CBS 2612、CBS 7435、CBS 9173-9189、DSMZ 70877、X-33、GS115、KM71 和 SMD1168 中的任一种。

12. 一种权利要求 9、10 或 11 中任一项所述的重组宿主细胞的多细胞稳定培养物。

13. 一种通过培养包含权利要求 1 ~ 7 的任一项所述启动子或权利要求 8 所述的表达构建物并包含在所述启动子的转录控制条件下编码所述 POI 的核酸的重组宿主细胞系, 或培养权利要求 9 ~ 11 中任一项所述的重组宿主细胞生产 POI 的方法, 包括步骤:

- a) 在表达所述 POI 的条件下培养所述细胞系, 和
- b) 回收所述 POI。

14. 权利要求 13 所述的方法, 其中, 所述 POI 是在生长限制性条件下表达。

15. 权利要求 13 或 14 所述的方法, 其中, 所述细胞系是在分批培养、分批补料培养或连续培养条件下, 和 / 或包含限制性碳源的培养基中培养。

16. 权利要求 15 所述的方法, 其中, 所述培养是在生物反应器中进行, 从分批培养期开始, 随后是分批补料培养期或连续培养期。

17. 权利要求 13 至 16 中任一项所述的方法, 其中, 所述 POI 是异源蛋白, 优选自治疗性蛋白, 包括抗体或其片段、酶和多肽、蛋白质抗生素、毒素融合蛋白、碳水化合物 - 蛋白质结合物、结构蛋白、调节蛋白、疫苗和疫苗类蛋白或微粒、加工酶、生长因子、激素和细胞因子, 或 POI 的代谢物。

18. 一种从真核细胞识别组成型启动子的方法, 包括步骤:

- a) 以高生长速率培养真核细胞;
- b) 进一步以低生长速率培养所述真核细胞;
- c) 提供步骤 a) 和 b) 所述细胞培养的样品,

d) 在所述样品中实施转录分析, 并将转录水平与所述细胞的所述天然 pGAP 启动子的转录水平比较; 和

f) 选择在所述高和低速生长速率时比天然 pGAP 启动子具有更高转录强度的组成型启动子, 优选地, 通过确定所述经识别的组成型启动子的转录水平, 其至少是所述天然 pGAP 启动子的 1.1 倍。

19. 一种包含启动子的分离的核酸序列的用途, 当与编码感兴趣的蛋白 (POI) 的核苷酸序列可操作的连接时, 该启动子指导其在宿主细胞中的表达, 且表达水平高于高生长速率和低生长速率时的天然 pGAP 启动子控制下的表达水平, 优选在一种通过培养采用所述核酸序列转化的宿主细胞产生所述 POI 的方法中的用途, 其中所述培养是在生物反应器中实施, 以分批培养期开始, 随后为分批补料期或连续培养期。

20. 根据权利要求 19 所述的用途, 其中, 所述表达水平在 0.015-0.15/h 范围内的高生长速率和低生长速率时确定。

21. 根据权利要求 19 ~ 20 所述的用途, 其中, 所述表达水平至少为 pGAP 启动子的 1.1 倍。

22. 权利要求 1 ~ 7 中的任一项所述的分离的核酸序列或权利要求 8 所述的表达构建物在通过培养用所述核酸序列和 / 或所述表达构建物转化的宿主细胞产生 POI 的方法中的应用, 优选地, 其中所述培养是在生物反应器中实施, 从分批培养期开始, 随后是分批补料期或连续培养期。

[0001] 申请人已经修改了权利要求 1 以便进一步限定所述 pCS1 启动子核酸序列。在提交的申请中,例如最初的权利要求 5,规定了关于 200 ~ 1500bp 的长度和与所述 SEQ ID 1 的序列具有至少 60%的同源性的权利要求特征。权利要求 1,2 和 3 经过重新撰写,明确了所述“SEQ ID 1 所示的 pCS1 核酸序列”是“pCS1 核酸序列”(SEQ ID 1)。有优先权的权利要求 4a) 的长度变种不再包括所述核酸序列 SEQ ID 7 和 8。

[0002] 所述分离的 pCS1 启动子核酸序列和其他修改过的整套权利要求书的主要事项未经公开也未得到在国际检索报告的参考文献的建议。D1 公开了长度为 345bp 的 SEQ ID No:87, 其中,只有 45bp 与 SEQ ID 1 同源。D5 公开了 GS115 菌株 *P. pestoris* 的全基因组序列,它不是分离的 pCS1 启动子核酸序列。本发明的启动子序列是新的,具有比已知启动子优越的特征。例如,本次申请的实施例说明了,与所述 pGAP 启动子 POI 生产的产量可以是比较惊人的。